

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Involution von Thymus und Peyer Plaques durch Interferon- α

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Nicolas Stephan

aus Bad Aibling

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. Hans-Gustav Klobeck

Mitberichterstatte: Professor Dr. med. Rudolf Hatz
Professor Dr. rer. nat. Elfriede Nößner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. David Anz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2013

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1.	Hintergrund und Fragestellung	1
2.	Einleitung	2
2.1.	Das Immunsystem	2
2.2.	<i>Pattern-recognition</i> -Rezeptoren	3
2.2.1.	Die Familie der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren und ihre Liganden	4
2.2.2.	Erkennung doppelsträngiger RNA	6
2.2.2.1.	<i>Toll-like</i> -Rezeptor 3	7
2.2.2.2.	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>	7
2.3.	Immunstimulation mit <i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>	8
2.4.	Typ I Interferone und ihr klinischer Einsatz	9
2.5.	Der Thymus als zentrales Organ der Entwicklung von T-Zellen	10
2.6.	Das Immunsystem des Darms – ein Alleskönner	12
2.6.1.	Entwicklung und Aufbau der Peyer Plaques	13
2.6.2.	Virale Infektionen des Gastrointestinaltrakts	14
3.	Material und Methoden	16
3.1.	Material	16
3.1.1.	Geräte	16
3.1.2.	Verbrauchsmaterialien	16
3.1.3.	Chemikalien	17
3.1.4.	Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie	17
3.1.5.	Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzen	17
3.1.6.	Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie	18
3.1.7.	Zusammenstellung der verwendeten FACS-Antikörper	18
3.1.8.	Versuchstiere	18
3.1.9.	Software	19
3.2.	Methoden	19
3.2.1.	Fotografie von Thymus und Peyer Plaques	19
3.2.2.	Wiegen von Organen	19
3.2.3.	Zählen und Entfernen von Peyer Plaques	20
3.2.4.	Histologie	20
3.2.4.1.	Einbettung und Schneiden	20
3.2.4.2.	Färbung mit Hämatoxylin und Eosin	20
3.2.5.	Methoden der Zellkultur	21
3.2.5.1.	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	21
3.2.5.2.	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus entnommenen Organen	21

3.2.6.	Durchflusszytometrie	21
3.2.6.1.	Allgemeines Funktionsprinzip	21
3.2.6.2.	Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen	23
3.2.6.3.	Analyse von intrazellulären Molekülen	24
3.2.6.4.	Analyse der <i>in vivo</i> Proliferation mit BrdU	24
3.2.6.5.	<i>In vivo</i> Apoptosemessung	25
3.2.6.6.	Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	25
3.2.7.	Eingriffe an der Maus	26
3.2.7.1.	Injektion unterschiedlicher Liganden	26
3.2.7.2.	Applikation von rekombinanten murinem Interferon- α	26
3.2.7.3.	<i>In vivo</i> Infektion mit dem <i>vesicular stomatitis virus</i>	26
3.2.7.4.	Wiegen der Versuchstiere	27
3.2.8.	Statistische Analyse	27
4.	Ergebnisse	28
4.1.	Thymusinvolution durch Stimulation des angeborenen Immunsystems	28
4.1.1.	Zellverlust im Thymus nach Stimulation mit <i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>	28
4.1.1.1.	Größen- und Gewichtsreduktion des Thymus nach Gabe von <i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>	28
4.1.2.	Histomorphologische Veränderungen im Thymus nach Gabe von <i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>	30
4.1.3.	Ursachen der Thymusinvolution in Mäusen nach Behandlung mit <i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>	32
4.1.3.1.	Verminderte Proliferation von Thymozyten durch <i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>	32
4.1.3.2.	Erhöhte Apoptose von Thymozyten nach Behandlung mit <i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>	34
4.1.4.	Systemische virale Infektion führt zur Thymusinvolution	36
4.1.5.	Behandlung mit Interferon- α führt zur Thymusinvolution	37
4.2.	Zellverlust in Peyer Plaques durch doppelsträngige Ribonukleinsäuren	39
4.2.1.	Massive Involution der Peyer Plaques nach Behandlung mit <i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>	39
4.2.2.	Keine signifikanten Veränderungen an Peyer Plaques nach Gabe von CpG und Resiquimod	42
4.2.3.	Zellverlust in unterschiedlichen Zellpopulationen nach Behandlung mit <i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>	43
4.2.4.	Histomorphologische Veränderungen in Peyer Plaques nach Behandlung	

mit <i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>	44
4.2.5. Systemische Infektion mit dem <i>vesicular stomatitis virus</i> führt zum Zellverlust in Peyer Plaques	47
4.2.6. Veränderungen an Peyer Plaques sind abhängig vom Interferon- α Rezeptor	48
4.2.7. Zellverlust in Peyer Plaques durch Interferon- α	49
4.2.8. Regeneration der Peyer Plaques nach Beendigung der Immunstimulation	50
5. Diskussion	53
5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	53
5.1.1. Temporäre Thymusinvolution nach Aktivierung des angeborenen Immunsystems	53
5.1.2. Systemische Virusinfektionen führen zu massiven Veränderungen an Peyer Plaques	54
5.2. Einordnung der Ergebnisse im Kontext der Literatur	55
5.2.1. Thymusinvolution vermittelt durch <i>thymic epithelial cells</i> oder dendritische Zellen	55
5.2.2. Mechanismen der erniedrigten Zellularität in Peyer Plaques nach Erhöhung der systemischen Interferon- α Spiegel	56
5.2.2.1. Direkter oder indirekter Effekt von Interferon- α auf die Peyer Plaque Subpopulationen	56
5.2.2.2. Quo vadis? Ursachen verminderter Zellularität in Peyer Plaques	57
5.2.2.2.1. Erniedrigte Immigration in Peyer Plaques	57
5.2.2.2.2. Apoptose und verminderte Proliferation	58
5.2.2.2.3. Verstärkte Emigration von Immunzellen aus Peyer Plaques nach systemischer Infektion	60
5.3. Klinische Relevanz	61
6. Zusammenfassung	64
7. Literaturverzeichnis	66
8. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	73
9. Danksagung	75
10. Veröffentlichungen	76
11. Lebenslauf	78

1. Hintergrund und Fragestellung

Die Reaktionen des adaptiven Immunsystems und die folgenden Veränderungen in sekundär lymphatischen Organen auf Infektionen sind in den letzten Dekaden intensiv untersucht und beschrieben worden. Zudem sind die Reaktionen des Organismus und vor allem die Regulation der Immunantwort auf gastrointestinale Infektionen Gegenstand der Forschung seit vielen Jahren.

Im Rahmen tumorimmunologischer Forschung der Arbeitsgruppe um Professor Bourquin wurde zufällig erkannt, dass nach Verabreichung des Immunmodulators *polyinosinic:polycytidylic acid* (Poly(I:C)) der Thymus der Versuchstiere massiv an Volumen und Masse verlor. Aufbauend auf diesen deskriptiven Untersuchungen sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit der dahinter liegende Mechanismus sowie die physiologische Bedeutung dieser Atrophie beleuchtet werden. Da die synthetische, doppelsträngige RNA Poly(I:C) auch als Imitator viraler Infektionen in der Forschung eingesetzt wird, sollen ferner die Auswirkungen systemischer viraler Infektionen auf den Thymus aufgezeigt werden. Virale Infektionen führen häufig zur Ausschüttung von Interferonen, weshalb die Ergebnisse weitere Auswirkungen von sich in Therapie befindlichen Typ I Interferonen auf den Thymus aufdecken sollen.

Der Thymus ist als zentrales Organ der T-Zell-Reifung für den Aufbau des T-Zell-Pools in sekundär lymphatischen Organen maßgeblich verantwortlich. Da Auswirkungen systemischer viraler Infektionen auf sekundär lymphatische Organe des Gastrointestinaltrakts bisher nur unzureichend untersucht wurden, sollen im zweiten Teil dieser Arbeit die Effekte von Poly(I:C), systemischen viralen Infektionen und Interferon- α -Applikationen auf Peyer Plaques beleuchtet werden.

2. Einleitung

2.1. Das Immunsystem

Der Mensch ist der ständigen Gefahr ausgesetzt, durch seine Umwelt oder entartete körpereigene Zellen in seiner Unversehrtheit gestört zu werden. So hat sich im Laufe der Jahrtausende ein komplexes System entwickelt, welches auf faszinierende Weise eine Vielzahl von exogenen und endogenen Gefahren beseitigen kann: Das Immunsystem. Dabei muss das Immunsystem eindringende und körpereigene schädliche Substanzen erkennen und ausschalten, ohne den gesunden Teil des Organismus zu schädigen. Diese Unterscheidung in „selbst“ und „fremd“, – worunter neben Eindringlingen auch krankhaft veränderte körpereigene Zellen wie Tumorzellen und Virus-infizierte Zellen verstanden werden – ist die zweite wichtige Aufgabe des Immunsystems.

Dabei werden klassischerweise zwei Komponenten des Immunsystems unterschieden. Einerseits das phylogenetisch ältere, unspezifische oder „angeborene“ Immunsystem, auf der anderen Seite das adaptive oder „erworbene“ Immunsystem, welches sich als hochspezifisches, effektives Abwehrsystem nur in Wirbeltieren entwickelt hat. Das adaptive Immunsystem besteht aus zwei Klassen spezialisierter Immunzellen, den B- und T-Lymphozyten. Da es nach Antigenkontakt circa drei bis fünf Tage dauert, bis eine ausreichende Abwehr durch das adaptive Immunsystem generiert wird, muss in der frühen Phase einer Infektion das angeborene Immunsystem seine Funktionen erfüllen.

Zum angeborenen Immunsystem werden dendritische Zellen (DC), Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gezählt. Im Gegensatz zum erworbenen findet sich das angeborene Immunsystem bei allen Lebewesen mit Körperhöhle, wie zum Beispiel auch Insekten (Immler et al. 2001). Einer der entscheidenden Unterschiede zwischen angeborener und adaptiver Immunität findet sich in den Erkennungsstrategien. Das adaptive Immunsystem bedient sich zur Unterscheidung von Selbst und Fremd der B- und T-Zell-Rezeptoren, welche somatisch während der Lymphozytenreifung durch Rekombination der Rezeptor-kodierenden Gene so angelegt werden, dass jeder Lymphozyt mit einem strukturell einzigartigen Rezeptor ausgestattet wird. Durch diesen Prozess der

somatischen Rekombination entsteht im Laufe des Lebens ein Repertoire von über 10^{11} verschiedenen T-Zellrezeptoren und Immunglobulinen (Ig) (Takeda et al. 2003).

Im Gegensatz dazu werden die Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität durch Keimbahn-kodierte Rezeptoren vermittelt. Somit ist die Spezifität eines jeden Rezeptors genetisch determiniert. Ein entscheidender Vorteil ist, dass diese Rezeptoren von Generation zu Generation vererbt werden können. Dadurch kann die angeborene Immunabwehr Pathogene bekämpfen, ohne dass der Organismus vorher mit dem Erreger selbst Kontakt gehabt haben muss. Da diese Rezeptoren jedoch rein Keimbahn-kodiert sind, ist ihre Vielfältigkeit im Vergleich zu dem durch somatische Rekombination mannigfaltigen Repertoire an B- und T-Zell-Rezeptoren stark begrenzt. Um dem Ungleichgewicht zwischen den vielfältigen und einem ständigen Selektionsdruck unterliegenden Mikroorganismen auf der einen Seite und dem begrenzten Repertoire an Erkennungsmechanismen auf der anderen Seite gerecht zu werden, haben sich im Laufe der Evolution die sogenannten *Pattern-recognition*-Rezeptoren herausgebildet.

2.2. *Pattern-recognition*-Rezeptoren

Pattern-recognition-Rezeptoren werden von einer Vielzahl an Effektorzellen, vor allem Antigen-präsentierenden Zellen wie DC, Makrophagen, Monozyten, und neutrophilen Granulozyten, exprimiert. Auch die Zellen der adaptiven Immunität besitzen diese Rezeptoren (Krieg 1999). *Pattern-recognition*-Rezeptoren erkennen einige hoch-konservierte Strukturen, die einer Vielzahl von Mikroorganismen gemeinsam sind: die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) (Janeway et al. 2002). Diese molekularen Erkennungsmuster stellen zwar strukturell eine sehr heterogene Gruppe dar, teilen jedoch einige gemeinsame Eigenschaften. So sind die durch das angeborene Immunsystem erkannten Strukturen essentiell für das Überleben des Pathogens und können trotz Selektionsdruck nicht verändert werden. Sie sind spezifisch für mikrobielle Pathogene, kommen im Wirtsorganismus nicht vor und sind in der Regel invariante Strukturen, die von einer Vielzahl von Pathogenen geteilt werden (Akira et al. 2006). Zu den durch *Pattern-recognition*-Rezeptoren erkannten Strukturen zählen unter anderem virale und bakterielle Ribonukleinsäuren (RNA) und Desoxyribonukleinsäuren (DNA) (Dostert et al. 2008).

Nach Aktivierung der *Pattern-recognition*-Rezeptoren durch PAMP rekrutiert das angeborene Immunsystem phagozytierende Zellen wie Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten und primäre Effektorzellen wie dendritische Zellen und NK-Zellen, welche antimikrobielle Peptide, Zytokine und Chemokine produzieren, um das Pathogen direkt zu eliminieren (Akira et al. 2006). Dieser erste Verteidigungsarm aktiviert zudem das adaptive Immunsystem, was zur humoralen und zellulären Antworten gegen das Pathogen führt (Pasare et al. 2004).

Pattern-recognition-Rezeptoren existieren in Membran-gebundener, zytoplasmatischer oder sezernierter Form. Die am besten charakterisierte Gruppe an *Pattern-recognition*-Rezeptoren stellen die Membran-gebundenen *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) dar. In den vergangenen Jahren wurden zudem die zytoplasmatischen *Pattern-recognition*-Rezeptoren der RIG-I-like Helikasen genauer erforscht.

2.2.1. Die Familie der *Toll-like*-Rezeptoren und ihre Liganden

Erstmalig wurden *Toll*-Rezeptoren in *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo sie die Produktion antimikrobieller Proteine stimulieren (Lemaitre et al. 1996). Mittlerweile sind 13 strukturhomologe TLR bekannt, die - was ihre Funktionalität und Verteilung auf Immunzellen angeht - einzelne speziesspezifische Unterschiede aufweisen. Die Wirkung der diversen Liganden wird über die jeweils passenden TLR vermittelt, deren Aktivierung in weiten Teilen in gemeinsamen Signaltransduktionswegen mündet. Bei Säugetieren lösen TLR eine Antwort des angeborenen Immunsystems über *nuclear factor-κB* (NF-κB) und *Interferon-regulatory factor* (IRF)-abhängige Signaltransduktionswege aus.

Formal können TLR in Oberflächenrezeptoren (TLR1, 2, 4, 5 und 6) sowie endosomale Rezeptoren (TLR3, 7, 8 und 9) gegliedert werden. An der Zelloberfläche gelegene Rezeptoren erkennen unter anderem Bestandteile bakterieller Zellwände, dagegen sind endosomale Rezeptoren in der Lage, virale RNA oder bakterielle DNA-Motive zu detektieren. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bisher bekannten TLR, ihrer Liganden und deren Herkunft. Abbildung 1 zeigt einen schematischen Überblick über TLR sowie die RIG-I-like Helikasen *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA-5) und *retinoic acid inducible gene 1* sowie ihrer Zielgene.

Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren (TLR) und wichtige exogene Liganden

TLR	PAMP	Herkunft	Referenz
TLR1	funktionell assoz. mit TLR2		
TLR2	Lipoproteine	Gram-pos. Bakterien	(Takeuchi et al. 1999)
	Zymosan	Hefen	(Ozinsky et al. 2000)
	<i>macrophage-activating lipopeptide 2</i>	Mykoplasmen	(Takeuchi et al. 2000)
	Lipoarabinomannan	Mykobakterien	(Underhill et al. 1999)
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren	(Alexopoulou et al. 2001)
TLR4	Lipopolysaccharid (LPS)	Gram-neg. Bakterien	(Poltorak et al. 1998; Hoshino et al. 1999)
	Protein F	RSV	(Kurt-Jones et al. 2000)
TLR5	Flagellin	Gram-neg. Bakterien	(Hayashi et al. 2001)
TLR6	funktionell assoz. mit TLR2		
TLR7	einzelsträngige RNA	Viren	(Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004)
	Guanosinanaloga (Loxoribine, Imiquimod, Resiquimod)	synthetische Moleküle	(Hemmi et al. 2002)
TLR8 (nicht funktionell im murinen System)	einzelsträngige RNA	Viren	(Heil et al. 2004)
	Resiquimod (R-848)	synthetische Moleküle	(Jurk et al. 2002)
TLR9	CpG ODN	Bakterien, Viren	(Hemmi et al. 2000)
TLR10 (nur human)	nicht bekannt	nicht bekannt	
TLR11	Profilin	uropathogene E. coli, Toxoplasma gondii	(Zhang et al. 2004) (Yarovinsky et al. 2005)
TLR12 (nur murin)	nicht bekannt	nicht bekannt	
TLR13 (nur murin)	Ribosomale RNA	Bakterien	(Oldenburg et al. 2012)

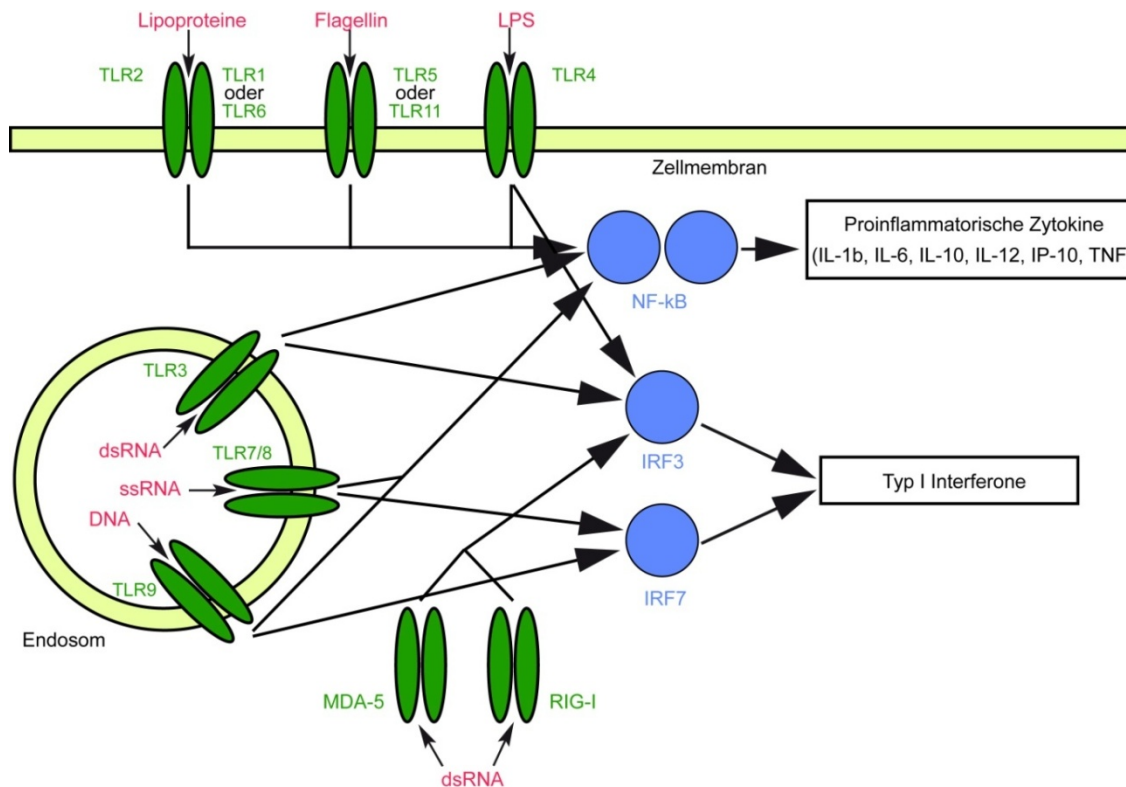


Abbildung 1: Überblick über die Toll-like-Rezeptoren und RIG-I-like Helikasen, ihrer Liganden, wichtige Zielgene und produzierte Zytokine

Zur Gruppe der TLR zählen Oberflächenrezeptoren (1, 2, 4, 5, 6, und 11), die mikrobielle Lipide und Proteine erkennen, sowie intrazellulär an Endosomen gebundene Rezeptoren (3, 7, 8, und 9), an die Nukleinsäuren binden können. Beide Gruppen können eine Aktivierung der NF-κB und IRF Signaltransduktionswege, sowie eine Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ I Interferonen auslösen. Die zytoplasmatisch gelegenen RIG-I-like Helikasen MDA-5 und *Retinoic acid inducible gene 1* aktivieren neben IRF3 in Abwesenheit der dritten RIG-I-like Helikase *laboratory of genetics and physiology 2* auch NF-κB. (Murali et al. 2008).

Einzelsträngig (ss), doppelsträngig (ds), Interleukin (IL), Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α).

2.2.2. Erkennung doppelsträngiger RNA

Einige *Pattern-recognition*-Rezeptoren sind in der Lage, Virus-stämmige Nukleinsäuren zu erkennen und Signaltransduktionswege zu aktivieren, die zur Synthese antiviraler Zytokine wie Typ I Interferone und proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF-α und IL-12 führen. Vor allem Typ I Interferone spielen bei der Viruselimination eine entscheidende Rolle. Sie regulieren die Transkription vieler Interferon-induzierter Gene hoch, welche Proteinsynthese, Wachstumsstopp und Apoptose beeinflussen. Somit wird ein antivirales Milieu aufgebaut (Kawai et al. 2008).

2.2.2.1. *Toll-like-Rezeptor 3*

Unter den *Toll-like-Rezeptoren* ist TLR3 in der Lage, doppelsträngige RNA zu erkennen, während TLR7 und TLR8 einzelsträngige RNA und TLR9 unmethylierte DNA mit Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Motiven erkennt. TLR3-defiziente Mäuse zeigen im Vergleich zum Wildtyp (WT) eine reduzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine und Typ I Interferone nach Stimulation mit genomischer RNA aus dsRNA Viren wie Reoviren (Rotaviren, Coltivirus) und dem synthetischen dsRNA-Analogen Poly(I:C). Neben dsRNA-Viren ist TLR3 unter anderem wichtig für die Immunantwort auf Infektionen mit Rhinoviren (häufigster Auslöser grippaler Infekte) (Hewson et al. 2005) und dem West-Nil-Virus, welches bei der Virusreplikation ein dsRNA-Intermediat produziert (Wang et al. 2004).

TLR3 wird unter anderem von dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Zellen, sowie Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert und ist intrazellulär an Endosomen gebunden (Matsumoto et al. 2003; Kawai et al. 2008). Die Rezeptordomäne für das Pathogen ragt in das Lumen des Endosoms, während die Adapterdomäne zur weiteren Signaltransduktion zum Zytoplasma gerichtet ist. So erkennt TLR3 durch Endozytose extrazellulär aufgenommene dsRNA, wie sie beispielsweise nach Apoptose virusinfizierter Zellen vorliegt, jedoch keine zytoplasmatische dsRNA. Im Gegensatz zu allen anderen *Toll-like-Rezeptoren* wird die Signaltransduktion nach TLR3-Aktivierung unabhängig von *myeloid differentiation primary response gene (88)* (MyD88) über *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* vermittelt, was nach weiterer Signaltransduktion zu einer Aktivierung von IRF3 und NF- κ B führt (Akira et al. 2006; Kawai et al. 2007). Auch wurde in Versuchen mit TLR3-defizienten Mäusen gezeigt, dass TLR3 nicht essentiell für die Generierung einer effektiven antiviralen Antwort ist. Dies ließ annehmen, dass weitere *Pattern-recognition-Rezeptoren* zur Erkennung von dsRNA vorliegen müssen (Edelmann et al. 2004; Schroder et al. 2005).

2.2.2.2. *Melanoma differentiation-associated gene 5*

Die zweite Gruppe von *Pattern-recognition-Rezeptoren*, die sich an der Erkennung viraler Nukleinsäuren beteiligen, sind die RIG-I-like Helikasen *Retinoic acid inducible gene 1*, MDA-5 und *laboratory of genetics and physiology 2* (Meylan et al. 2006; Yoneyama et al. 2007). Im Gegensatz zu den membrangebundenen TLR befinden sich RIG-I-like Helikasen im Zytoplasma, wo sie die dort vorhandene RNA erkennen,

welche unter anderem bei der Virusreplikation gebildet wird. *Retinoic acid inducible gene 1* und MDA-5 sind in der Lage mit viraler RNA zu interagieren und lösen eine Signaltransduktion aus, die zur Transkription von Typ I Interferonen und weiteren proinflammatorischen Zytokinen führt. *Retinoic acid inducible gene 1* ist essentiell zur Erkennung einer Reihe von ssRNA Viren wie Paramyxoviren, Influenza-Viren oder dem Japanische Enzephalitis Virus. Dagegen wird MDA-5 zur Erkennung anderer RNA Viren wie zum Beispiel Erregern aus der Gruppe der Picornaviren benötigt. Der an Mitochondrien-gebundene *interferon- β promoter stimulator 1* stellt den Rezeptor für MDA-5 dar. Die weitere Signaltransduktion endet in der Aktivierung von IRF3, NF- κ B und einer intensiven Typ I Interferon-Produktion (Kawai et al. 2005).

2.3. Immunstimulation mit ***Polyinosinic:polycytidylic acid***

Polyinosinic:polycytidylic acid ist eine synthetische, doppelsträngige RNA, die aus zwei komplementären Strängen von Inosinsäuren und Cytidinsäuren besteht. Die Länge des Poly(I:C)-Stranges kann variieren, wobei *low molecular weight* Poly(I:C) mit einer Länge von 0,2 bis 1 kb und *high molecular weight* Poly(I:C) mit einer Länge von 1,5 bis 8 kb voneinander unterschieden werden. Poly(I:C) wird in der Forschung als Immunstimulator zur Simulation viraler Infektionen (Alexopoulou et al. 2001) eingesetzt. Dies geschieht durch Stimulierung des angeborenen Immunsystems über die Aktivierung von *Toll-like-Rezeptor 3* (TLR3) und die zytoplasmatische Helikase *melanoma differentiation-associated gene 5* (Kato et al. 2005; Gitlin et al. 2006; Kato et al. 2006). Unterschiedliche *knock-out* Experimente von Kato und Kollegen (Kato et al. 2006) zeigten, dass zwar MDA-5-defiziente (MDA-5^{-/-}) Mäuse kein Interferon- α und Interferon- β nach Stimulation mit Poly(I:C) produzieren, jedoch *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* ^{-/-} Mäuse eine normale Typ I Interferon-Produktion vorweisen. Die durch Poly(I:C) angestoßene Signaltransduktion endet in einer starken Zytokinausschüttung, wobei vor allem Typ I Interferone und hier im Speziellen Interferon- α ausgeschüttet werden.

2.4. Typ I Interferone und ihr klinischer Einsatz

Erstmals wurde Interferon 1957 von Isaacs und Lindenmann als ein Protein beschrieben, das in lebenden Zellen durch Stimulation mit hitzeinaktivierten Influenzaviren induziert wird (Isaacs et al. 1957). Interferone, die man heute in Typ I, II und III Interferone einteilt, werden von verschiedenen Zellen produziert und binden an unterschiedliche Rezeptoren (Farrar et al. 1993; Pestka 2000; Meyer 2009). Zu den kürzlich entdeckten Typ III Interferonen zählt nur Interferon- λ , welches unter anderem in der Bekämpfung des West-Nil-Virus eine Funktion haben soll (Ma et al. 2009). Interferon- γ ist der einzige Vertreter der Typ II Interferone und wird hauptsächlich durch stimulierte T-Zellen, myeloide dendritische Zellen (mDC) und NK-Zellen gebildet. Es wurde intensiv sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Immunantworten untersucht und wird heute als das wichtigste immunregulatorische Protein der Interferon-Familie angesehen (Billiau 1996).

Die Familie der Typ I Interferone binden alle an denselben Rezeptor (IFNAR), der aus zwei Untereinheiten besteht. Momentan setzt sich die Gruppe der Typ I Interferone im humanen System aus mindestens 14 verschiedenen Interferon- α -Subtypen, einem Interferon- β und einem Interferon- ω zusammen. Sie wird hauptsächlich als antivirale Proteingruppe angesehen, da die Interferone vor allem im Rahmen viraler Infektionen gebildet werden. Typ I Interferone werden rasch auf mikrobielle Stimuli vor allem von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) sezerniert und aktivieren eine Vielzahl von Effektorzellen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. Darüber hinaus verhindern Typ I Interferone direkt die Virusreplikation in infizierten Zellen (Isaacs et al. 1957), steigern die Zytotoxizität von Makrophagen und NK-Zellen (Ortaldo et al. 1981), fördern die Proliferation von T-Gedächtniszellen (Zhang et al. 1998), erhalten aktivierte T-Zellen am Leben (Marrack et al. 1999) und begünstigen die Antikörperproduktion durch B-Zellen (Le Bon et al. 2001). Neben der Induktion einer effektiven antiviralen Immunität (Muller et al. 1994) spielen sie eine entscheidende Rolle in der Immunantwort gegen Bakterien und Protozoen (Bogdan 2000).

Interferone werden schon seit einiger Zeit klinisch zur Therapie von Autoimmunkrankheiten, Tumorleiden und Viruserkrankungen eingesetzt. Interferon- β -1a und Interferon- β -1b werden verwendet, um Multiple Sklerose, eine Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems, zu behandeln und zu kontrollieren. Die Therapie ist wirksam bei schubförmigen Verläufen der Multiplen Sklerose durch Verlangsamung von Krankheitsprogression und Aktivität, sowie bei der

sekundär-progressiven Multiplen Sklerose, indem die Anzahl an Schüben reduziert wird (Paolicelli et al. 2009).

Auch in der antitumoralen Therapie werden Interferone (oft in Kombination mit Chemotherapie und Bestrahlung) eingesetzt. Bei hämatoonkologischen Erkrankungen wie Haarzelleukämie, chronisch myeloischer Leukämie, nodulären Lymphomen, dem Kaposi-Sarkom und kutanen T-Zell Lymphomen finden Typ I Interferone ihren Einsatz (Goldstein et al. 1988). Auch Patienten mit fortgeschrittenen kutanen Melanomen erhalten eine Therapie mit Interferon- α (Kirkwood et al. 1996; Kirkwood et al. 2002). Die antitumorale Wirksamkeit der Interferone beruht zum einen auf antiproliferativen Eigenschaften und zum anderen auf der Aktivierung und Differenzierung von NK-Zellen, die Tumorzellen abtöten können sowie auf der Aktivierung von dendritischen Zellen. Weiterhin wird Interferon- α bei der Therapie myeloproliferativer Syndrome, wie der Polycythaemia vera und der essentiellen Thrombozythämie eingesetzt, wobei die Wirkung auf suppressiven Effekten auf das Knochenmark beruht (Fruchtman 2004).

Die viralen Erkrankungen Hepatitis B und C werden mit Interferon- α , oft in Kombination mit anderen antiviralen Therapeutika behandelt (Shepherd et al. 2000; Cooksley 2004). Die mit Interferon therapierten Patienten haben eine anhaltende antivirale Immunantwort und können das Hepatitis Virus sogar eliminieren. Biopsien zeigen verminderte Leberschäden und Zirrhose. Außerdem gibt es Anhalte dafür, dass die sofortige Gabe von Interferon- α -2b nach Infektion mit dem Hepatitis C Virus den Übergang in den chronischen Verlauf der Erkrankung verhindern kann und die Auftretenswahrscheinlichkeit hepatozellulärer Karzinome reduziert (Ishikawa 2008).

2.5. Der Thymus als zentrales Organ der Entwicklung von T-Zellen

Neben B-Zellen stellen T-Zellen die Hauptvertreter des adaptiven Immunsystems dar. Die T-Zelllinie beinhaltet $CD4^+$ T-Helferzellen, $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen und FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (T_{reg}). Wie alle Zelllinien des Blutes stammen T-Zellen von hämatopoetischen Stammzellen ab, die sich im Knochenmark befinden (Morrison et al. 1995). Im Gegensatz zu den anderen Blutzelllinien durchlaufen jedoch T-Zellen den Großteil ihrer Reifung in einem eigenständigen, auf die Entwicklung von T-Zellen spezialisierten Organ im Mediastinum – dem Thymus (Miller et al. 1967).

Hämatopoetische Stammzellen durchlaufen eine Vielzahl an Entwicklungsschritten in Knochenmark und Blut, bevor ein Teil von ihnen als sogenannte *thymic settling progenitors* in den Thymus migriert, um sich zu reifen T-Zellen zu entwickeln (Zlotoff et al. 2008). Makroskopisch besteht der murine Thymus aus zwei Lappen, von denen jeder in eine äußere Rindenregion (Kortex) und eine innere Markregion (Medulla) gegliedert ist. Die Entwicklung von T-Zellen koinzidiert mit der streng regulierten Wanderung definierter Zwischenpopulationen innerhalb dieser zwei Hauptkompartimente (Witt et al. 2005).

Vorläuferzellen von Thymozyten gelangen in den Thymus durch postkapilläre Venolen nahe der kortiko-medullären Grenze (Lind et al. 2001). Der Eintritt dieser Präkursoren in den Thymus ist eher ein intermittierender denn ein kontinuierlicher Vorgang (Foss et al. 2001). Zu diesem Zeitpunkt ihrer Entwicklung sind die Zellen noch nicht darauf beschränkt sich zu Zellen der T-Zelllinie zu entwickeln und sind daher noch multipotent (Cai et al. 2007). Da sie in dieser Entwicklungsphase auf ihrer Oberfläche weder CD4 noch CD8 besitzen, werden sie als doppelt negative (DN) Zellen bezeichnet.

Die Population der doppelt negativen Zellen besteht aus vier frühen T-Zell Untergruppen, die anhand ihrer Expression der Moleküle CD25 und CD44 unterschieden werden. Nach ihrer Ankunft nahe der kortiko-medullären Grenze unterziehen sich die DN1 Zellen ($CD25^-CD44^+$) einer Vielzahl an Zellteilungen (Penit et al. 1995; Vasseur et al. 2001). Nach Beendigung dieser Teilungsphase migrieren die Präkursoren in die zentrale Rindenregion, wo sie zur DN2 ($CD25^+CD44^+$) Entwicklungsphase avancieren, ihre Multipotenz verlieren und sich somit nur noch zu T-Zellen entwickeln können. Sie migrieren weiter nach außen bis sie die äußerste Region des Kortex erreichen, die als subkapsuläre Zone bezeichnet wird (Lind et al. 2001). Etwa ein Drittel der Zellen passieren die hier stattfindende positive Selektion, bei der die Bindungsfähigkeit des T-Zell Rezeptors (TCR) zu seinem spezifischen *major histocompatibility complex* (MHC) Molekül getestet wird als DN3 Zellen ($CD25^+CD44^-$). Die Migrationsrichtung kehrt um, sodass die Zellen unter intensiver Proliferation zurück in Richtung kortiko-medulläre Grenze wandern und nun als DN4 Zellen ($CD25^-CD44^-$) bezeichnet werden. In dieser Entwicklungsphase vollzieht sich die unter 1.1 beschriebene somatische Rekombination der TCR und die Zellen beginnen mit der Co-Expression von CD4 und CD8, weshalb sie doppelt positive T-Zellen genannt werden (Petrie et al. 2007).

Doppelt positive T-Zellen sind zur Mitose nicht mehr fähig. Sie befinden sich in der gesamten Rindenregion des Thymus mit Ausnahme der subkapsulären Region, in der sich die DN3 Zellen aufhalten. Es ist auch diese breite Rindenregion, in der die Zellen ihre Positivität für einen der Marker CD4 oder CD8 verlieren. Die Interaktion von TCR und MHC I und II scheint für den Vorgang obligat, doch gibt es unterschiedliche Theorien, wie es zu diesem Rezeptorverlust kommt (Germain 2002). Schließlich migrieren die jungen T-Zellen in die Markregion, wo sie der negativen Selektion unterzogen werden. Dendritische Zellen und medulläre Epithelzellen präsentieren den sich entwickelnden T-Zellen körpereigene Antigene über MHC. Im Falle einer Rezeptorinteraktion gehen T-Zellen mit TCR gegen körpereigenes Antigen in Apoptose, wodurch das Auftreten von Autoimmunreaktionen vermieden (Sprent et al. 1990) wird. Nach weiteren Selektionsprozessen in der zentralen Markregion stehen schlussendlich reife, naive T-Zellen mit unterschiedlichsten TCR gegen Fremdpeptide bereit, die – geleitet durch Chemokine – über die kortiko-medulläre Grenze den Thymus verlassen, um sekundär lymphatische Organe wie Milz, periphere Lymphknoten und Peyer Plaques zu bevölkern.

2.6. Das Immunsystem des Darms – ein Alleskönner

Im darmassoziierten Lymphsystem, welches sich vom Rachen bis zum Enddarm zieht, befinden sich etwa 70 % der Immunzellen des gesamten Organismus. Zu diesem System zählen unter anderen Tonsillen, Lymphfollikel der Schleimhaut, solitary Lymphozyten in Epithel und Lamina Propria sowie Peyer Plaques. Eine der herausragenden Rollen des darmassoziierten Lymphsystem ist es, Balance zu halten zwischen Immuntoleranz gegenüber Myriaden kommensaler Antigene (wie die der ca. 10^{14} Bakterien im Darm) und Antigenen aus Nahrung sowie der Fähigkeit zur Erkennung von Pathogenen mit konsekutiver Induktion einer effektiven Immunantwort (Steinman et al. 2003). Unter dem Einfluss intestinaler epithelialer Zellen und der kommensalen Flora des Darmsystems tragen Antigen-präsentierende dendritische Zellen entscheidend dazu bei, T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen und IgA-produzierende Zellen im „*steady-state*“ zu regulieren und bei Infektion zu induzieren (Tezuka et al. 2010; Steinman et al. 2003).

2.6.1. Entwicklung und Aufbau der Peyer Plaques

Primäre Immunantworten werden in sekundären lymphatischen Organen, zu denen Milz, Lymphknoten, isolierte Lymphfollikel und Peyer Plaques zählen, induziert. Diese Gewebe finden sich im gesamten Körper an strategisch sinnvollen Positionen, wo fremdartige Antigene im Falle einer Infektion mit größter Wahrscheinlichkeit angetroffen werden. Regionale und periphere Lymphknoten liegen entlang von Lymphgefäßen, die Antigene und Antigen-präsentierende Zellen nicht-lymphoider Organe transportieren. Im Gegensatz dazu besitzen Peyer Plaques und andere Schleimhaut-assoziierte sekundäre lymphoide Organe keinen afferenten Lymphstrom, sondern erhalten Kontakt zu Antigenen direkt über das Schleimhautepithel der Mukosa (Randall et al. 2008).

Peyer Plaques wie auch andere sekundäre lymphatische Organe entwickeln sich während der Embryogenese und in der frühen postnatalen Phase. Dieser Vorgang tritt unabhängig von Antigen- oder Pathogenkontakt an vorbestimmten Orten im Organismus als Resultat komplexer Interaktionen unterschiedlicher hämatopoetischer, mesenchymaler und endothelialer Zellen statt. Einige, doch bei Weitem nicht alle dieser zellulären und molekularen Mechanismen, die auch an der Erhaltung der Architektur sekundärer lymphatischer Organe und deren Funktion bei Immunantwort beteiligt sind, sind bekannt (Drayton et al. 2006).

Peyer Plaques erhielten ihren Namen durch den Schweizer Anatom Johann Conrad Peyer (1653 – 1712), der diese zum ersten Mal in seinem Werk *„Exercitatio anatomico-medica de glandulis intestinorum earumque usu et affectionibus“* 1677 beschrieb und als *„noduli lymphoidei aggregati“* bezeichnete. Makroskopisch betrachtet handelt es sich beim Menschen um 1 bis 4 cm lange, circa 1 cm breite Erhebungen, die sich fast ausschließlich im Ileum (selten im Jejunum und Duodenum) befinden. In der Kindheit ist die Zahl der Peyer Plaques deutlich größer (circa 300) als im Erwachsenenalter (circa 40). Sie liegen gegenüber der Ansatzstelle des Mesenteriums, wobei das lymphatische Gewebe in der Mukosa liegt und oft bis in die Submukosa reicht. Eine Plaque besteht aus circa 300 zusammengelagerten („aggregierten“) Lymphfollikeln (B-Zell-Regionen) und parafollikulären Zonen (T-Zell-Regionen). Der Teil des Follikelrandwalles, der zum Darmlumen zeigt, ist verdickt (Kappe). Oberhalb eines Follikels wölbt sich das Domareal (kurz: Dom), ein lymphozytenreiches Mukosagewebe, kuppelförmig vor. In diesem Domepithel kommen *microfold* (M) Zellen vor, die Antigene aus dem Darmlumen aufnehmen und mittels vesikulären Transports

durch sich durchschleusen. In ihren basolateralen Taschen enthalten sie antigenpräsentierende dendritische Zellen, T und B Lymphozyten sowie Fortsätze von Makrophagen (Welsch 2005). Im Gegensatz zum Menschen sind Peyer Plaques der Maus über den gesamten Dünndarm – vom Pylorus bis zur Ileozökalklappe – verteilt. Durchschnittlich lassen sich etwa acht bis neun dieser hier etwa 1,5 x 1,5 mm großen Plaques makroskopisch ausmachen. Ihr mikroskopischer Aufbau entspricht dem humaner Peyer Plaques.

2.6.2. Virale Infektionen des Gastrointestinaltrakts

Als Gastroenteritiden werden Entzündungen des Magendarmtrakts bezeichnet, die unter anderem zu Diarrhö führen. Sie können durch Kontakt mit kontaminierten Nahrungsmitteln, Wasser oder als Schmierinfektionen übertragen werden. Am häufigsten werden gastrointestinale Infektion durch Viren, seltener durch Bakterien, deren Toxine, Parasiten und Unverträglichkeitsreaktionen gegen Nahrungsbestandteile oder Medikamente hervorgerufen. Jedes Jahr sterben weltweit circa fünf bis acht Millionen Menschen an inadäquat oder nicht behandelter Gastroenteritis (Kasper et al. 2008). Sie ist führende Todesursache bei Kindern unter fünf Jahren (King et al. 2003). Mindestens 50% aller schweren viralen Gastroenteritiden werden durch Rotaviren ausgelöst, circa 20% durch Noroviren. Weitere häufige Erreger viraler Gastroenteritiden sind Adenoviren und Astroviren (Parashar et al. 2006).

Wie unter 1.3.2 beschrieben, gehören Rotaviren zur Familie der *Reoviridae* und besitzen ein Genom aus doppelsträngiger RNA. Der *in vivo* Gewebstropismus von Rotaviren ist sehr spezifisch. Sie infizieren typischerweise nur Enterozyten an der Spitze intestinaler Villi des Menschen und einer Vielzahl von Tieren (Lopez et al. 2004). Die Balance zwischen Toleranz und Immunantwort in der intestinalen Mukosa wird durch Charakteristika des kommensalen Keims oder Pathogens – wie potentielle Zielzelle und *Pathogen-associated molecular pattern* – und der Expression von *Pattern-recognition*-Rezeptoren durch Zellen des Wirts bestimmt (Berberich et al. 2003; Iwasaki 2007). Unter den Zellen, die *Pattern-recognition*-Rezeptoren wie *Toll-like*-Rezeptoren und *RIG-I-like* Helikasen ausbilden, spielen dendritische Zellen eine zentrale Rolle bei der Generierung einer Immunantwort. Neben Aktivierung des angeborenen Immunsystems sind sie die effizientesten Antigen-präsentierenden Zellen für T und B-Zellen (Steinman et al. 2006). Dabei finden sich intestinale dendritische Zellen einerseits in induktiven Regionen wie Peyer Plaques und mesenterialen

Lymphknoten, wo sie durch Prozeption und Präsentation pathogener Antigene für eine effektive Immunantwort notwendig sind (Niess et al. 2006) und auf der anderen Seite in der Lamina Propria, die als Ziel- und Effektorregion gilt (Niess et al. 2005).

Im Rahmen gastrointestinaler Infektionen mit beispielsweise Rotaviren werden sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem aktiviert. Durch virale dsRNA-aktivierte *Pattern-recognition*-Rezeptoren wird ein Antwort des angeborenen Immunsystems mit Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie eine schnelle Infiltration des infizierten Gewebes mit Entzündungszellen hervorgerufen (Fukata et al. 2009).

Wie erwähnt besitzen Peyer Plaques wie auch mesenteriale Lymphknoten eine hohe Konzentration naiver T und B-Zellen. Zur adaptiven Immunantwort werden virale Antigene mit Hilfe der M Zellen aus dem Darmlumen zum subepithelialen Dom der Peyer Plaques transportiert (Niedergang et al. 2005). Dort werden diese Antigene durch DC aufgenommen, deren *Pattern-recognition*-Rezeptoren aktiviert, Aktivierungsmarker wie CD40, CD80 und CD86 hochreguliert und somit der Phänotyp reifer dendritischer Zellen angenommen (Lopez-Guerrero et al.). Diese kostimulatorischen Aktivierungsmarker werden zur effizienten Aktivierung und Proliferation von T und B-Zellen sowie regulatorischer T-Zellen der Peyer Plaques benötigt. Zudem wird diskutiert, dass diese dendritischen Zellen auch B-Zellen über einen T-Zell unabhängigen Mechanismus aktivieren (Steinman et al. 2006).

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Digitalkamera Canon Digital Ixus	Canon (Krefeld, D)
FACSCalibur	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
FACSCanto II	"
Mikroskop (Axiovert 25)	Zeiss (Jena, D)
Mikroskop (Axiovert 40C)	"
Waage (CPA 1003S)	Sartorius (Göttingen, D)
Waage (LP 6209)	"

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Cellstar 5 ml Pipetts	Greiner Bio-one (Frickenhausen, D)
Cellstar 50 ml Sterile Plastic Tubes	"
Combitipps Plus	Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
Microlance 3	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
Microtest U-Bottom	"
Multipette Plus	Eppendorf (Hamburg, D)
NORM-Ject 1 ml	Henke Sass Wolf (Tullingen, D)
Pipetus	Hirschmann (Eberstadt, D)
Polystyrene Round-Bottom Tubes 5 ml	BD Biosciences (Bedford, MA, USA)
Safe-Seal micro tube 2 ml	Sarstedt (Newton, NC, USA)
Spritzen BD Discardit II 2 ml, 5 ml, 20ml	Becton Dickinson (San Jose, Ca, USA)
Sterilin Sterile Disposable Plastic Pipetts	Barloworld (Stone, Staffordshire, UK)
Zellsiebe 40 µm, 70 µm, 100 µm	BD Biosciences (Bedford, MA, USA)

3.1.3. Chemikalien

<i>Aqua ad injectabilia</i> Braun	Braun (Melsungen, D)
Bacillol	Bode Chemie (Hamburg, D)
Bromdesoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich (München, D)
Fixation/Permeabilization Concentrate	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Fixation/Permeabilization Diluent	"
Heparin-Natrium Braun 25000 I.E./5 ml	Braun (Melsungen, D)
Isofluran (Forene®)	Abbott (Wiesbaden, D)
Isopropanol (70 Vol%)	Apotheke Innenstadt Universität München
Formaldehyd-Lösung 3,5 – 3,7 %	Otto Fischar GmbH & Co. KG (Saarbrücken, D)
Permeabilization Buffer (10x)	eBioscience (San Diego, CA, USA)
PharmLyse (10x) Lysereagenz	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Tryptanblau	"
Trypsin (10x)	PAA (Pasching, A)

3.1.4. Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
--	-------------------------------------

3.1.5. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzen

CpG 1826 (CpG)	Coley Pharmaceutical Group (Langenfeld, D)
Poly(I:C)	Invivogen (San Diego, CA, USA)
Rekombinantes murines Interferon- α	Dr. M. Schlapschy, TUM (Weihenstephan, D)
Resiquimod	"

3.1.6. Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

Fixierungspuffer

25 Vol % Fixation/Permeabilization Concentrate
75 Vol % Fixation/Permeabilization Diluent
pH 7,0

Permeabilisierungspuffer

10 Vol % Permeabilisierungspuffer
pH 7,0
in PBS

FACS-Puffer

2 Vol % FCS
pH 7,0
In PBS

Erythrozyten-Lysepuffer

PharmLyse (10x) 1:10
in PBS

3.1.7. Zusammenstellung der verwendeten FACS-Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Klon	Herkunft
Anti BrdU/DNase	BrdU		Becton Dickinson
Anti CD3e	CD3e	145-2C11	BD/Pharmingen
Anti CD4	CD4 (L3T4)	RM4-5	BD/Pharmingen
Anti CD8a	CD8a (Ly-2)	53-6.7	BD/Pharmingen
Anti CD11b	CD11b (Mac-1)	M1/70	BD/Pharmingen
Anti CD11c	CD11c	HL3	BD/Pharmingen
Anti CD19	CD19	1D3	BD/Pharmingen
Anti CD25	IL-2 R α chain, p55	PC61	BD/Pharmingen
Anti CD44	CD44	IM7	BD/Pharmingen
Anti CD45R/B220	CD45R/B220	RA3-6B2	BD/ Pharmingen
Anti Foxp3	Foxp3	FJK-16a	eBioscience

3.1.8. Versuchstiere

C57BL/6 und Balb/c Mäuse wurden von Harlan-Winkelmann (Borchen, D) erworben. Versuche mit Interferon- α -Rezeptor-Knockout-Mäusen (IFNAR^{-/-}) wurden in Kooperation mit Frau Dr. Zoe Waibler vom Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt. Alle Tierversuche wurden nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes sowie mit behördlicher Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt.

3.1.9. Software

Adobe Creative Suite	Adobe (San Jose, CA, USA)
BD FACSDiva	BD Biosciences (Heidelberg, D)
EndNote 6.0	Thomson Reuters (Carlsbad, CA, USA)
Flowjo	Treestar (Ashland, OR, USA)
Graphpad Prism	GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)
Mac OS leopard	Apple (Cupertino, CA, USA)
Microsoft Office	Microsoft (Seattle, WA, USA)
Microsoft Windows XP	"
SPSS	SPSS (Chicago, IL, USA)

3.2. Methoden

3.2.1. Fotografie von Thymus und Peyer Plaques

Nach Entnahme des Thymus und Transport bei 4°C wurde dieser auf ein Zellstoffpapier gelegt und mit zwei Pinzetten von überschüssigem Bindegewebe gesäubert. Danach wurden die Organe auf einer anthrazitfarbenen Unterlage aus Stahl entsprechend positioniert und mit PBS feucht gehalten. Der Darm wurde an Pylorus und Ileocoekalklappe durchtrennt und der Dünndarm in seiner Gesamtheit und ohne Entfernung von Speiseresten auf einem grünen OP Abdecktuch positioniert. Die Fotografien wurden bei Tageslicht und ohne Blitz aufgenommen.

3.2.2. Wiegen von Organen

Die zu wiegenden Organe wurden nach ihrer Entnahme und dem Transport in PBS bei 4°C auf Zellstoffpapier gelegt. Nach 2 Sekunden wurde das Organ gewendet damit überschüssige PBS Flüssigkeit durch das Zellstoffpapier aufgenommen werden konnte. Danach wurde das Organ auf Wägepapier gelegt und mit einer Präzisionswaage gewogen.

3.2.3. Zählen und Entfernen von Peyer Plaques

Nachdem der Dünndarm wie oben beschrieben entnommen und auf dunkelgraues Zellstoffpapier gelegt wurde, konnten die Peyer Plaques, welche sich vom Untergrund gut abhoben, gezählt werden. Dabei wurde der Dünndarm systematisch dreimal nach sichtbaren Peyer Plaques untersucht. Nach der Zählung wurden die Peyer Plaques mit Pinzette und feiner Schere vom Dünndarm abgetrennt, wobei darauf geachtet wurde, dass möglichst wenig Darmgewebe an den Peyer Plaques haften blieb.

3.2.4. Histologie

Die Histologie der Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung wurde mit Hilfe von Frau Dr. rer. nat. Susanne Radtke-Schuller des Instituts für Anatomie und Zellbiologie (Lehrstuhl II) der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

3.2.4.1. Einbettung und Schneiden

Die Dünndarmschnitte wurden mit Hilfe von Igelstäbchen auf Kork gespannt und mit 4 % Paraformaldehyd behandelt, nummeriert und in Einbettkästchen gegeben. Danach wurden die Schnitte für 45 Minuten mit Leitungswasser gewässert und das Programm für den Einbettautomaten mit 24 Stunden gewählt. Die 5 µm dicken Paraffinschnitte wurden auf Objektträger des Typs Superfrost gegeben, und es wurde jeder zehnte Schnitt gefärbt. Aus Sicherheitsgründen wurden die Schnitte neun und elf auch aufgezogen. Somit wurden die Schnitte neun, zehn und elf aufgezogen und gefärbt.

3.2.4.2. Färbung mit Hämatoxylin und Eosin

Die Schnitte wurden mit Xylol 1 für 20 Minuten und Xylol 2 für 10 Minuten sowie mit einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Es erfolgte die Färbung mit Hämalaun für 3 Minuten, Bläuung für 10 Minuten in Leitungswasser und Destillierung. Dann wurde für 90 Sekunden mit Eosin gefärbt. Nach der Destillierung wurden die Schnitte kurz mit 70- und 80-prozentigen Ethanol, sowie zwei Mal für eine Minute mit 96-prozentigen Ethanol und zwei Mal für

zwei Minuten mit 100-prozentigen Ethanol behandelt. Schließlich wurden sie Xylol ausgesetzt und für die Betrachtung unter dem Lichtmikroskop bereitgestellt.

3.2.5. Methoden der Zellkultur

3.2.5.1. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblauausschlusstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau angefärbt. Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

3.2.5.2. Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus entnommenen Organen

Thymus, periphere Lymphknoten, mesenterische Lymphknoten und Peyer Plaques wurden analog zur Milz vorbereitet, mit der Ausnahme, dass für diese Organe keine Erylyse benötigt wurde. Nach Entnahme der Organe und Transport in PBS bei 4° C wurden die Zellen mit Hilfe eines 40 µm Zellsiebs auf einem 50 ml Plastikröhrchen (Falcon) vereinzelt. Dazu wurden die jeweiligen Organe in das Zellsieb gegeben und mit einem 5 ml Spritzenstempel durch das Sieb gepresst. Nach Abzentrifugieren der Zellen (400 G, 4° C, 7 min) und Abkippen des Überstandes wurde das Zellpellet von Milzen in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte das Auffüllen des 50 ml Falcons mit PBS zum Abstoppen der Erylyse und erneutes Abzentrifugieren. Das auf diese Weise gewonnene Zellpellet wurde dann in PBS resuspendiert und auf die für die weiteren Analysen gewünschte Konzentration gebracht.

3.2.6. Durchflusszytometrie

3.2.6.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse verschiedener Eigenschaften von Zellen in einer Flüssigkeitssuspension. Die Einzelzellsuspension wird durch eine dünne

Metallkapillare aufgenommen und von einer anderen Flüssigkeit (*FACSFlow*), welche mit höherer Geschwindigkeit strömt, umspült. Dadurch wird die Einzelzellsuspension so ausgedünnt, dass die Zellen eine nach der anderen im Zentralstrahl des Flüssigkeitsstroms fließen. Dieses Prinzip nennt sich *hydrodynamic focusing*. Die Zellen fließen durch den Detektionspunkt und werden dort von einem Laser bestrahlt. Dabei wird der Laser bei Durchdringung der Zelle in seiner ursprünglichen Richtung (*forward scatter* (FSC)) und senkrecht dazu (*side scatter* (SSC)) gestreut. Die Streuwinkel korrelieren beim FSC mit Größe und beim SSC mit Granularität, wodurch sich bei Betrachtung des sogenannten FSC-SSC-Bildes verschiedene Zellpopulationen unterscheiden lassen.

Darüber hinaus lassen sich in der Vorbereitung Fluoreszenz-gebundene Antikörper gegen bestimmte Oberflächen- und/oder intrazelluläre Moleküle zur Zellsuspension zugeben. Bei Anregung der Fluorochrome durch den Laser emittieren diese Licht spezifischer Wellenlängen im rechten Winkel zur Laserrichtung. Dieses passiert Filter und wird auf Detektoren umgeleitet, wodurch ein bestimmtes Fluoreszenzmuster entsteht.

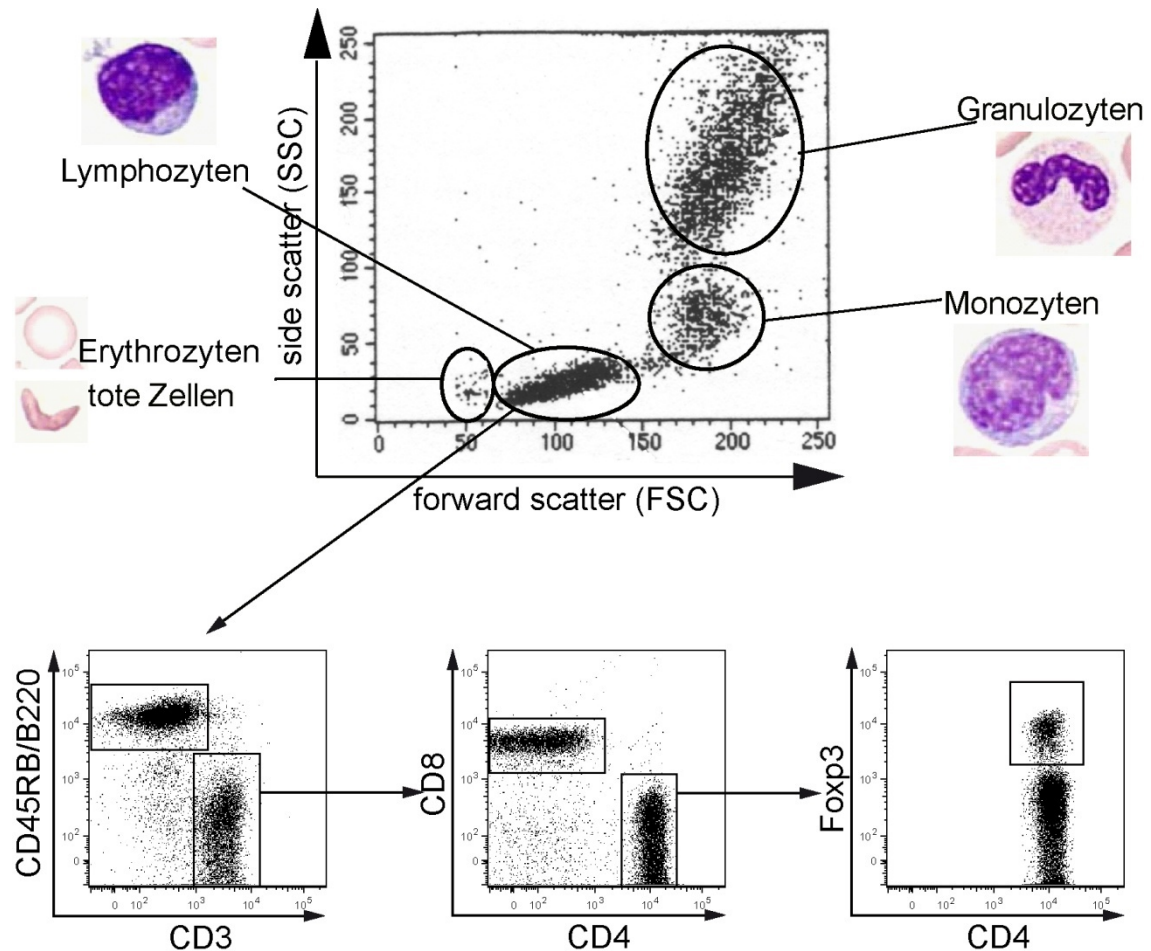


Abbildung 2: Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie

Oben ist ein FSC/SSC Plot der Milz einer C57BL/6 dargestellt, in dem sich unterschiedliche Zellpopulationen darstellen lassen. Agranulär und klein zeigen sich Erythrozyten, tote Zellen und fragmentierte Zellen. Etwas größer und leicht granulärer sind Lymphozyten (B-Zellen und T-Zellen) zu erkennen. Monozyten sind nochmals größer und weisen mehr Granularität als Lymphozyten auf. Granulozyten sind etwa gleich groß wie Monozyten, jedoch deutlich granulärer. In der vorliegenden Arbeit wurde im FSC/SSC Plot ein Rahmen (*gate*) um die Lymphozyten gesetzt und nur diese Population weiter analysiert. Durch den Einsatz von Fluorochrom-gebundenen Antikörpern gegen Oberflächen- und/oder intrazelluläre Moleküle konnte die Population der Lymphozyten weiter unterteilt werden. B-Zellen wurden charakterisiert als $CD45RB/B220^+$, $CD3^-$; zytotoxische T-Zellen als $CD45RB/B220^-$, $CD3^+$, $CD8^+$ und T-Helfer Zellen (T_H -Zellen) als $CD45RB/B220^-$, $CD3^+$, $CD4^+$. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) als $CD45RB/B220^-$, $CD3^+$, $CD4^+$, $Foxp3^+$ und plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) als $CD11b^+$, $CD45RB/B220^+$.

3.2.6.2. Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen

Nach Vereinzelung der Zellen (siehe oben) und Resuspension in 50 μ l PBS wurden in einem 5 ml FACS-Röhrchen zwischen 5×10^5 und 5×10^6 Zellen mit den gewünschten Fluorochrom-gebundenen, monoklonalen Antikörpern für 25 min bei 4° C und in Dunkelheit inkubiert. Die Antikörper wurden dabei in einer Verdünnung von 0,4:100 bis 1,4:100 eingesetzt. Danach wurde das FACS-Röhrchen mit PBS aufgefüllt und

abzentrifugiert (400 G, 7 min, 4° C). Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellett in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit einem FACSCanto II oder FACSCalibur analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Flowjo.

3.2.6.3. Analyse von intrazellulären Molekülen

Bei der Färbung von intrazellulären Molekülen wurden zunächst gewünschte Oberflächenantigene gefärbt und danach zweimal gewaschen (siehe oben). Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Zellpellet in 200 µl Fixierungspuffer resuspendiert und für 30 min bei 4° C und in Dunkelheit inkubiert. Danach wurde das FACS Röhrchen mit PBS aufgefüllt, abzentrifugiert (400 G, 7 min, 4° C), in 200 µl Permeabilisierungspuffer resuspendiert, abzentrifugiert, nochmals in 200 µl Permeabilisierungspuffer resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in 50 µl Permeabilisierungspuffer resuspendiert und die gewünschten FACS-Antikörper gegen intrazelluläre Moleküle zugegeben (Verdünnung 1,4:100). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4°C und in Dunkelheit. Im Falle der Färbung mit Anti-Foxp3 wurde nach 15 min der Inkubation das FACS-Röhrchen gevortext und danach für weitere 15 min inkubiert. Wie auch bei der Oberflächenfärbung wurden die Zellen nach dem zweiten Waschschrift in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit den Geräten FACSCanto II oder FACSCalibur analysiert. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit Flowjo.

3.2.6.4. Analyse der *in vivo* Proliferation mit BrdU

Um die Proliferation von Immunzellen *in vivo* zu charakterisieren, wurde den Mäusen (C57BL/6) 21 Stunden, zwölf Stunden und sieben Stunden vor Organentnahme je 2 mg (10 mg/ml) Bromdesoxyuridin (BrdU) intraperitoneal injiziert. BrdU ist ein Thymidin Analogon, welches sich während der Synthese von Desoxynukleinsäuren (DNS) bei der Zellteilung mit Adenin paart und somit in die DNS eingebaut wird. Das weitere Vorgehen entspricht dem der Färbung intrazellulärer Moleküle mit dem Unterschied, dass 10 ml Anti-BrdU/DNAse eingesetzt wurden.

3.2.6.5. *In vivo* Apoptosemessung

Um den Anteil apoptotischer beziehungsweise toter Zellen zu bestimmen, wurde eine FACS-Färbung mit Annexin und Propidiumjodid (PI) verwendet. Bei der Apoptose verliert die Zelle unter anderem ihre Membranasymmetrie. Dadurch werden auch Anteile von Membranproteinen, die normalerweise Richtung intrazellulär gerichtet sind, extrazellulär gerichtet. So beispielsweise Phosphatidylserin in früher Phase der Apoptose, was durch Annexin gebunden werden kann. PI kann intakte Zellmembranen nicht passieren und interkaliert zwischen die Basen von DNA und RNA toter Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben. Somit sind Annexin⁺ und gleichzeitig PI⁺ Zellen jene, die kürzlich in Apoptose gingen. Annexin⁺ und PI⁺ Zellen sind diejenigen, die schon länger tot sind. Bei dieser Population kann nicht gesagt werden, ob die Zellen durch Apoptose oder aufgrund anderer Gründe zugrunde gingen.

Beim praktischen Vorgehen werden die Zellen wie oben beschrieben oberflächlich gefärbt. Nach dem zweiten Waschschrift werden sie in 200 µl Annexin *binding buffer* resuspendiert, gevortext und bei 400 G für 7 min bei 4° C abzentrifugiert. Danach werden die Zellen in 50 µl Annexin *binding buffer* resuspendiert und 8×10^5 Zellen mit 2 µl Annexin und 2 µl PI für 15 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Dann muss innerhalb der nächsten Stunde mit dem Durchflusszytometer analysiert werden, da sonst die PI-Färbung zu unspezifisch wird. Annexin wird im Fluorescein-Isocyanat (FITC)-Kanal und PI im Phycoerythrin (PE) Kanal gemessen.

3.2.6.6. Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitation	Emission
Phycoerythrin (PE)	565 nm	575 nm
Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm
Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP)	488 nm	675 nm
PacificBlue	403 nm	456 nm
Allophycocyanin-Cy7 (APC-Cy7)	756 nm	778 nm
Phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7)	565 nm	780 nm

3.2.7. Eingriffe an der Maus

3.2.7.1. Injektion unterschiedlicher Liganden

Poly(I:C) wurde zu 250 µg in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst in sterilem PBS (250 µl je Gabe) injiziert. Es wurde langsam und vorsichtig i.p. beziehungsweise subkutan in eine Bauchfalte appliziert. In den meisten Versuchen wurde Poly(I:C) zweimal in einem Abstand von 72 Stunden gegeben. In einigen Versuchen erfolgte lediglich eine einmalige Gabe. Falls nicht anders angegeben wurde zweimal injiziert. Die Organe wurden 48 Stunden nach der letzten Applikation entnommen. CpG wurde in einer Menge von 50 µg bei einer Konzentration von 250 µg/ml i.p. oder subkutan analog zum Vorgehen bei Poly(I:C) appliziert. Von R-848 wurden 30 µg in einer Konzentration von 150 µg/ml i.p. gespritzt.

3.2.7.2. Applikation von rekombinanten murinem Interferon-α

Das von Dr. Martin Schlapschy des Lehrstuhls für biologische Chemie der TUM in Freising-Weihenstephan bereitgestellte murine Interferon-α wurde in einer Menge von 12 µg bei einer Konzentration von 60 µg/ml gelöst in PBS intraperitoneal appliziert. Es wurde an sechs aufeinanderfolgenden Tagen in einem Abstand von 24 Stunden gegeben. Die Organe wurden 24 Stunden nach der letzten Gabe von Interferon-α entnommen.

3.2.7.3. In vivo Infektion mit dem *vesicular stomatitis virus*

Die *in-vivo* Infektion mit dem *vesicular stomatitis virus* (VSV) wurde in Kooperation mit PD Dr. med. Anne Krug der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar durchgeführt. Weibliche, acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden mit dem *indiana strain* des VSV Virus, der auf BHK21 Zellkulturen generiert wurde, infiziert. Die Infektion erfolgte fünf Tage sowie 48 Stunden vor Organentnahme intraperitoneal. Bei jeder Injektion wurden 10^6 *plaque forming units* gelöst in 200 µl PBS appliziert.

3.2.7.4. Wiegen der Versuchstiere

Die für die Blutentnahme narkotisierten Mäuse wurden täglich vorsichtig auf eine Waage gelegt, bevor ihnen Blut entnommen und Interferon- α appliziert wurde.

3.2.8. Statistische Analyse

Bei allen *in vivo* und *in vitro* Versuchen sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel und die Streuung der Werte als *standard error of mean* (SEM) angegeben. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der zweiseitige Student t-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p Werten $< 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$ angenommen und ist durch Markierung mit *, ** und *** angezeigt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS oder GraphPad Prism durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Excel, Microsoft Office Picture Manager, Adobe Illustrator, Adobe InDesign und Adobe Photoshop.

4. Ergebnisse

4.1. Thymusinvolution durch Stimulation des angeborenen Immunsystems

4.1.1. Zellverlust im Thymus nach Stimulation mit *polyinosinic:polycytidylic acid*

Um die Auswirkungen einer Immunstimulation durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems auf den Thymus zu untersuchen, wurden Mäuse mit Poly(I:C) therapiert. *In vivo* Effekte einer Immunmodulation durch Poly(I:C) auf den Thymus wurden im Gegensatz zu Auswirkungen auf sekundär-lymphatische Organe bisher nur unzureichend untersucht.

Weiblichen, acht bis zwölf Wochen alten C57BL/6 Mäusen wurden dazu 250 µg (1 mg/ml, gelöst in sterilem Wasser) Poly(I:C) zweimal i.p. injiziert. Poly(I:C) wurde dabei 120 Stunden und 24 Stunden vor Organentnahme gespritzt.

4.1.1.1. Größen- und Gewichtsreduktion des Thymus nach Gabe von *polyinosinic:polycytidylic acid*

Zunächst wurde makroskopisch untersucht, ob und wenn ja in welcher Form sich eine Behandlung mit Poly(I:C) auf Morphologie und Integrität des Thymus auswirkt. Nach Euthanasierung durch zervikale Dislokation in Isoflurannarkose, Eröffnung des Thorax und Entnahme des präkordial liegenden Thymus fiel bei makroskopischer Betrachtung auf, dass zwar die allgemeine, bilobuläre Struktur erhalten blieb, jedoch ein massiver Verlust an Größe und Volumen zu sehen war (*Abbildung 3 A*). Um diese Veränderung zu quantifizieren, wurde der Thymus mit einer sensiblen Waage gewogen. Das durchschnittliche Thymusgewicht einer adulten, unbehandelten C57BL/6 Maus betrug circa 70 mg, nach Therapie mit Poly(I:C) lag das Durchschnittsgewicht bei 21 mg. Dies entspricht einer 3,3-fachen Reduktion des Gewichtes (*Abbildung 3 B links*). Dieser Verlust an Größe und Gewicht nach Therapie mit Poly(I:C) war auf den Thymus beschränkt. Sekundär lymphatische Organe wie hier repräsentativ die Milz, zeigten nach der Therapie eher eine Zunahme an Größe und Gewicht (*Abbildung 3 B rechts*).

Makroskopische Veränderungen an nicht-lymphatischen Organen wie Kolon, Lunge, Leber und Herz konnten nicht festgestellt werden, was beschriebenen Beobachtungen entspricht (Zhou et al. 2007). Der gezeigte Befund wurde durch Anz und Kollegen bereits beschrieben und konnte hier reproduziert werden.

A



B

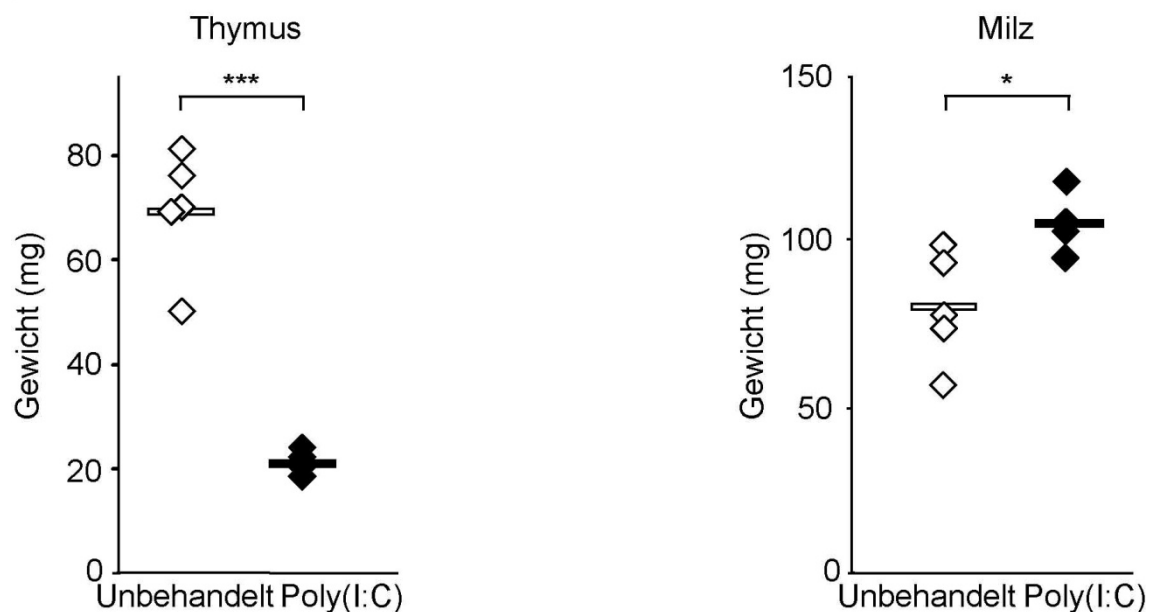


Abbildung 3: Verlust an Größe und Gewicht des Thymus nach Poly(I:C)-Gabe

A, der Thymus von unbehandelten (*oben*) und Poly(I:C)-behandelten weiblichen C57BL/6 Mäusen 24 Stunden nach der letzten von zwei Injektionen mit Poly(I:C). B, Gewicht von Thymus (*links*) und Milz (*rechts*) in Milligramm (mg) 24 Stunden nach der letzten von zwei Poly(I:C) Injektionen. Thymus und Milz stammen von denselben Mäusen wie in A. Jede Raute beschreibt ein Individuum, die Balken zeigen die Mittelwerte. n = 4 - 5 pro Gruppe. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente.

4.1.2. Histomorphologische Veränderungen im Thymus nach Gabe von *polyinosinic:polycytidylic acid*

In 3.1.1 wurde der bereits durch Anz beschriebene Befund reproduziert, dass die intraperitoneale Applikation von Poly(I:C) zur makroskopischen Verkleinerung des Thymus führt. Weiter konnte die Arbeitsgruppe von Anz und Kollegen zeigen, dass dies durch einen Zellverlust in verschiedenen Thymussubpopulationen bedingt ist.

Um zu beurteilen, ob die Therapie mit Poly(I:C) auch zu mikroanatomischen Veränderungen führt, wurden aus Thymus von behandelten und unbehandelten Mäusen Paraffinschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Makroskopisch ist der Thymus aus Lappen aufgebaut, welche sich aus zahlreichen Läppchen (Lobuli) zusammensetzen und durch Bindegewebe voneinander getrennt sind. Wie in 1.5 angesprochen, besteht der Thymus mikroskopisch aus einer zellreichen Rinde, in der die Thymozyten stark proliferieren und dem Mark, in dem die Zellen lockerer zwischen Bindegewebe angeordnet sind (Ceredig et al. 2002).

Die histologische Betrachtung der Thymusschnitte zeigte, dass sowohl Rinde als auch Mark nach Behandlung mit Poly(I:C) an Volumen verloren. Vor allem die Rinde reduzierte sich in Ausdehnung und Zellularität, was zu einer Erniedrigung des Verhältnisses von Rinde zu Mark führte. Neben dem Zellverlust zeigten sich auch Veränderungen der Struktur. Zum einen wirkte der gesamte Thymusaufbau der Poly(I:C)-behandelten Tiere ungeordneter. Daneben fiel vor allem bei Betrachtung der Grenze zwischen Rinde und Mark auf, dass diese normalerweise sehr klare Grenze in den behandelten Thymus verwaschen und unscharf erschien (*Abbildung 4*). Diese Ergebnisse bestätigen die von Kollegen gemachten Beobachtungen.

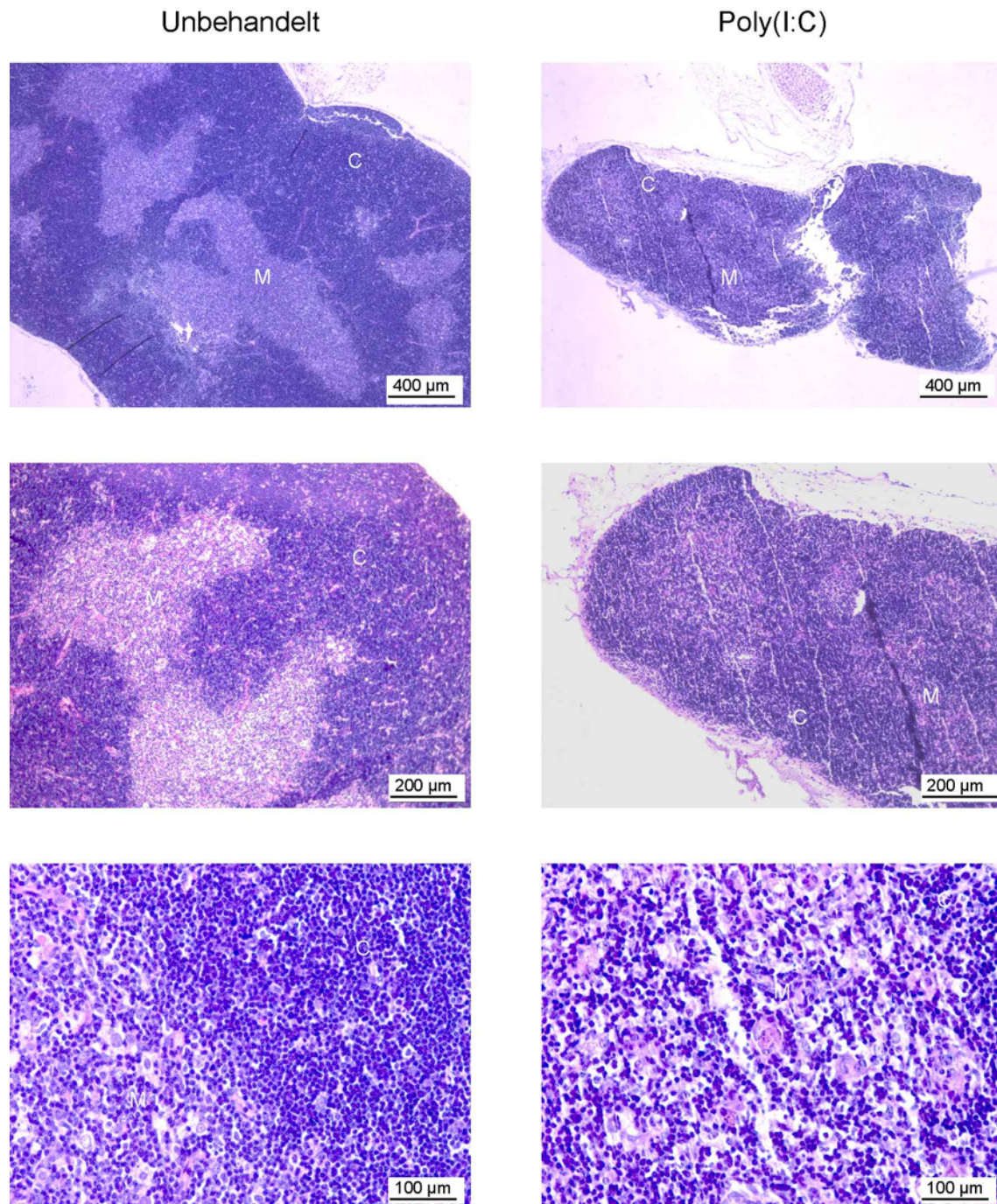


Abbildung 4: Poly(I:C)-vermittelte histomorphologische Veränderungen des Thymus

HE-gefärbte, in Paraffin gebettete Schnitte von C57BL/6 Mäusen 48 Stunden nach der letzten von zwei Poly(I:C) Injektionen. Oberste Reihe 5-fache, mittlere Reihe 10-fache und unterste Reihe 40-fache Vergrößerung. C = Kortex (Rinde), M = Medulla (Mark). n = 3 für jede Gruppe. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente und stellen Reproduktionen bereits gemachter Beobachtungen dar.

4.1.3. Ursachen der Thymusinvolution in Mäusen nach Behandlung mit *polyinosinic:polycytidylic acid*

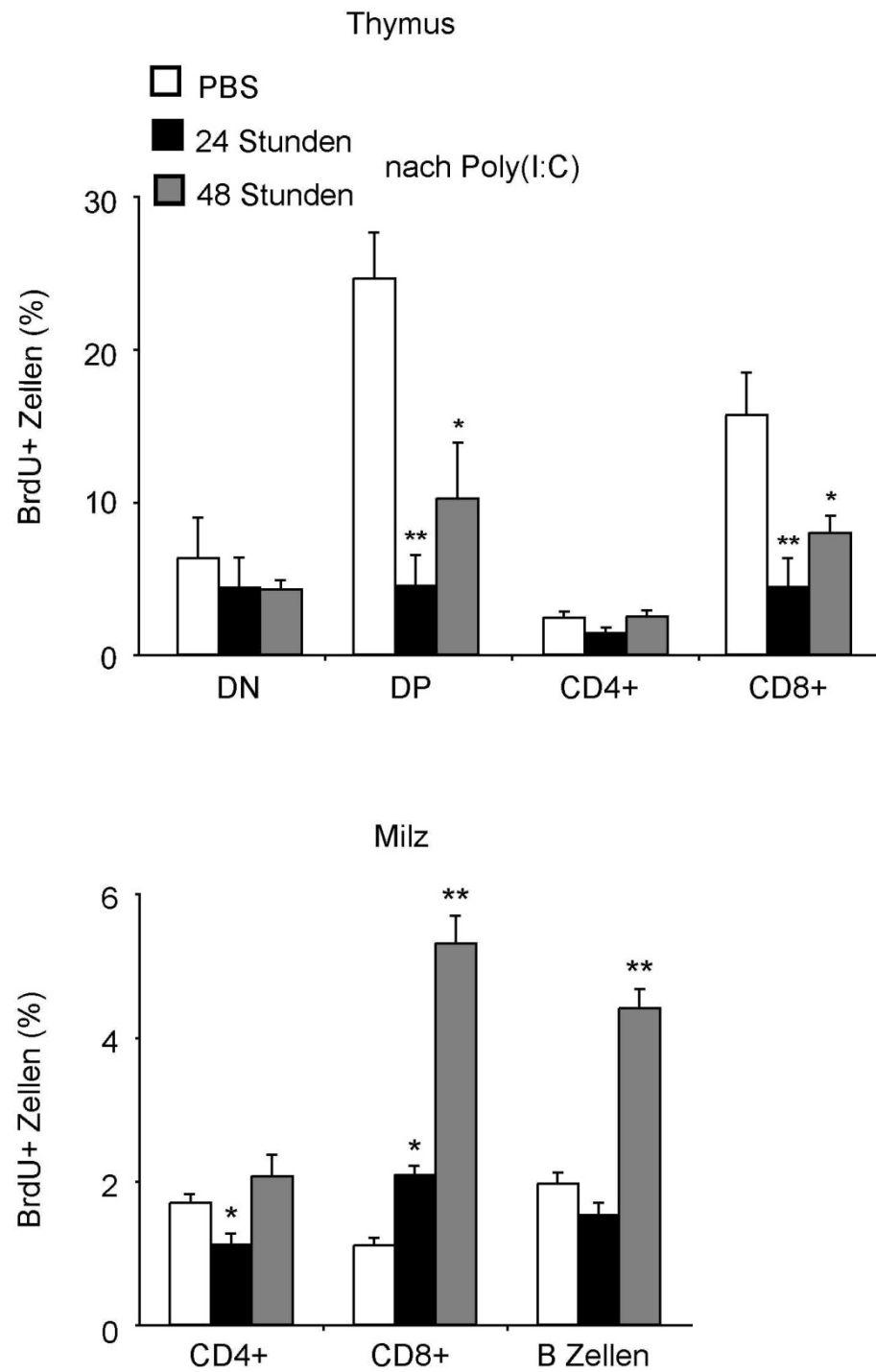
Nachdem gezeigt wurde, dass die Gabe von Poly(I:C) zu Verkleinerung und histologischen Veränderungen durch Verlust an Zellen in allen Thymuspopulationen führt, stellte sich die Frage nach den Ursachen für diesen Zellverlust. Dabei waren folgende Möglichkeiten denkbar. Einerseits können Veränderungen im Migrationsverhalten, sprich verminderte Immigration von unreifen T-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, oder erhöhte Emigrationsrate von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in sekundär-lymphatische Organe eine erniedrigte Zellzahl im Thymus bedingen. Der Thymus besitzt eine hohe Proliferationsrate von T-Zellen, vor allem in der Rindenregion (Cai et al. 2007). Eine verminderte Proliferation bei unverminderter Emigration stellt ein weiteres mögliches Erklärungsmodell dar. Schließlich könnte eine Induktion von programmiertem Zelltod (Apoptose) durch Poly(I:C) den Zellverlust erklären.

4.1.3.1. Verminderte Proliferation von Thymozyten durch *polyinosinic:polycytidylic acid*

Um die Möglichkeit einer verminderten Proliferation von sich entwickelnden Thymozyten als Ursache für die Thymusinvolution nach Poly(I:C) Gabe zu quantifizieren, wurde der Anteil an proliferierenden Zellen mittels *in vivo* Gabe von Bromdesoxyuridin (BrdU) bestimmt. Thymus und Milz von Mäusen, die 21, zwölf und sieben Stunden vor Organentnahme BrdU erhielten, wurden 24 und 48 Stunden nach der letzten von zwei Poly(I:C) Injektionen entnommen und der prozentuale Anteil an BrdU⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Im Thymus konnte ein signifikanter Verlust des Anteils proliferierender T Lymphozyten beobachtet werden (*Abbildung 5 A oben*). Die Reduktion der Proliferation war besonders stark in der zellreichen Population der doppelt positiven Thymozyten sowie der CD8⁺ Lymphozyten zu erkennen. Dahingegen veränderte sich die ohnehin niedrige Proliferation der doppelt negativen und CD4⁺ Lymphozyten nach Therapie mit Poly(I:C) nur geringfügig. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Proliferation zwar 24 Stunden nach Poly(I:C) Gabe intensiv supprimiert war, jedoch 48 Stunden danach wieder anstieg. Im Gegensatz dazu zeigte die Milz nach *in vivo* Stimulation mit Poly(I:C) bei den CD8⁺ Lymphozyten bereits nach 24 Stunden, bei den B-Zellen (B220⁺) und CD4⁺ Zellen 48 Stunden nach Stimulation eine erhöhte Proliferationsrate (*Abbildung 5 A unten*).

Abbildung 5 B zeigt einen repräsentativen FACS *plot* von Kontrolltieren (*links*) und Poly(I:C)-behandelten Mäusen 24 Stunden nach der letzten Injektion der Immunstimulanz (*rechts*).

A



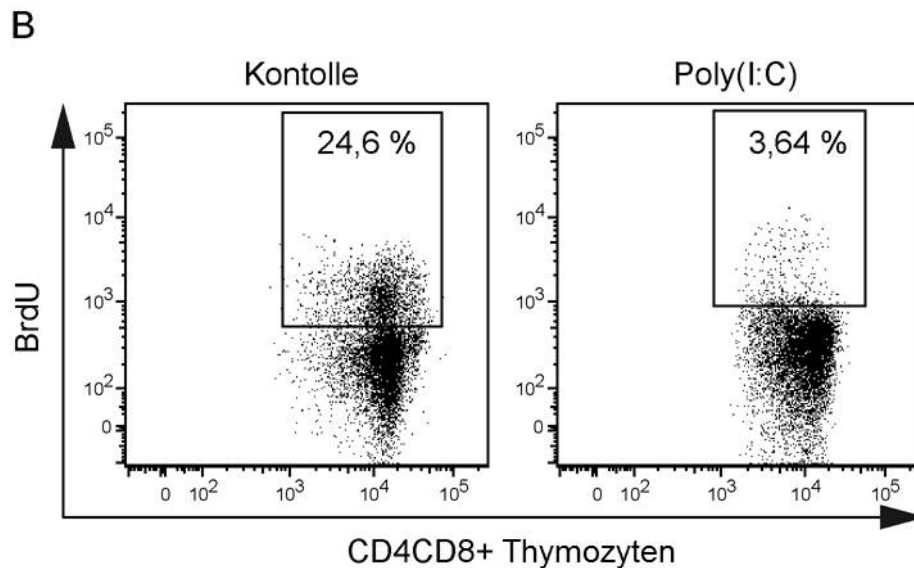


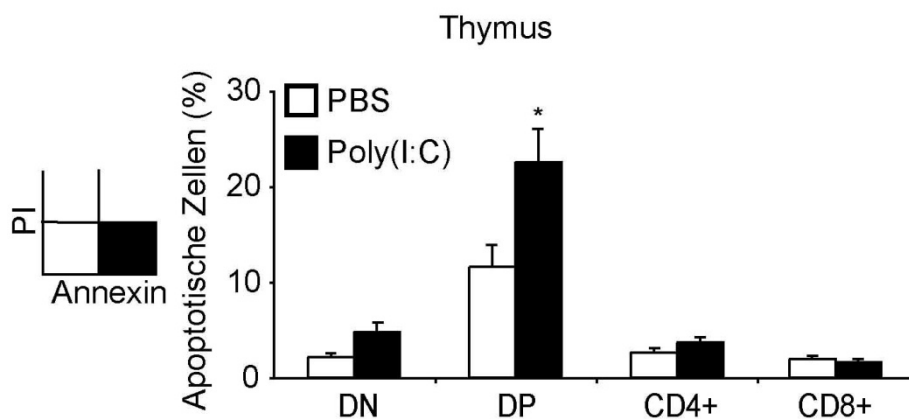
Abbildung 5: Verminderte Proliferation von Thymozyten nach Behandlung mit Poly(I:C)

A, prozentualer Anteil BrdU⁺ Thymozyten 24 Stunden (*schwarz*) und 48 Stunden (*grau*) nach der letzten von zwei Poly(I:C) Injektionen. Thymus: DP: 24,6 % vor, 4,5 % 24 Stunden nach Poly(I:C); CD8⁺: 15,7 % vor, 4,4 % 24 Stunden nach Poly(I:C). Milz: CD8⁺: 1,1 % vor, 5,3 % 48 Stunden nach Poly(I:C); B-Zellen: 1,5 % vor, 4,4 % 48 Stunden nach Poly(I:C). Die gezeigten Subpopulationen von Thymozyten (*oben*) und Splenozyten (*unten*) wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Balken geben die Mittelwerte \pm SEM an. B, repräsentative FACS *plots* von CD4CD8 doppelt positiven Thymozyten vor (*links*) und 24 Stunden nach (*rechts*) der zweiten Poly(I:C) Injektion. n = 4 - 5 C57BL/6 Mäuse pro Gruppe.

4.1.3.2. Erhöhte Apoptose von Thymozyten nach Behandlung mit polyinosinic:polycytidylic acid

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Proliferation im Thymus nach Behandlung mit Poly(I:C) zurückgeht, wurde die Rolle von Apoptose als potentielle Ursache für die Thymusinvolution analysiert. Dazu wurden Thymozyten nach der Annexin V, PI Methode gefärbt (Vermes et al. 1995). Thymus und Milz wurden 48 Stunden nach der letzten von zwei Poly(I:C) Injektionen entnommen und die Zellen begutachtet, die kurz vor der Analyse in Apoptose gingen. Vorher wurden sie von den Zellen getrennt, die schon länger tot waren. Es zeigte sich, dass frühe Apoptose (Annexin V⁺, PI⁻) in der Population der doppelt positiven Thymozyten nach Poly(I:C) Therapie signifikant erhöht war (*Abbildung 6 A*). Im Gegensatz dazu zeigten T-Zellen der Milz keine signifikanten Veränderungen in der Apoptoserate nach Poly(I:C) Behandlung (*Abbildung 6 B*).

A



B

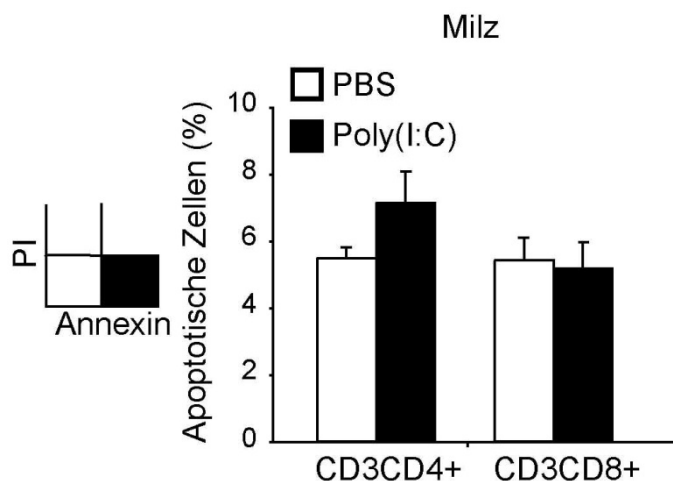


Abbildung 6: Erhöhte Apoptose von Thymozyten nach Poly(I:C) Therapie

A, Prozentualer Anteil Annexin V⁺/PI⁻, frühapoptotischer Thymozyten ohne und unter Poly(I:C) Behandlung 48 Stunden nach der letzten von zwei Injektionen, *gezeigt* auf die gezeigten Subpopulationen. Annexin V⁺/PI⁻ DP: 11,6 % vor, 22,6 % nach Poly(I:C) Applikation. B, Annexin V⁺/PI⁻ T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen in der Milz zeigten keine signifikanten Veränderungen der Apoptoserate nach Behandlung mit Poly(I:C). Die Balken geben die Mittelwerte \pm SEM an. n = 4 - 5 für jede Gruppe.

Damit konnte nachgewiesen werden, dass der Zellverlust im Thymus nach Behandlung mit Poly(I:C) durch einen Rückgang der Proliferation und einer erhöhten Apoptoserate bedingt war.

4.1.4. Systemische virale Infektion führt zur Thymusinvolution

Es konnten Veränderungen am Thymus durch Stimulation mit der synthetischen doppelsträngigen RNA Poly(I:C) gezeigt werden. Wie im Einleitungstext beschrieben, wird Poly(I:C) in der Forschung als Substanz eingesetzt, um virale Infektionen zu simulieren. Um zu untersuchen, ob sich diese Veränderungen auch unter in der Natur vorkommenden Bedingungen reproduzieren lassen, wurde eine Infektion mit dem *vesicular stomatitis virus* (VSV) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein einzelsträngiges RNA Virus aus der Familie der Rhabdoviridae, welches eng mit dem Tollwutvirus verwandt ist. Es ist der Erreger der Stomatitis vesicularis bei Huftieren, kann aber auch Krankheitserscheinungen beim Menschen hervorrufen.

Acht Wochen alte C57/BL6 Mäuse wurden zwei Tage (48 Stunden) sowie fünf Tage (120 Stunden) vor Organentnahme mit je 10^6 *plaque forming units* des VSV systemisch infiziert. Am Tag der Organentnahme sahen die Tiere gesund aus. Es konnten keine Unterschiede in Gewicht, Fellbeschaffenheit, oder Aktivität zu den mit PBS-behandelten Kontrolltieren festgestellt werden. Doch bei Untersuchung des Thymus war eindeutig festzustellen, dass dieser nach Infektion an Volumen und Gewicht verlor (*Abbildung 7*). Im Gegensatz dazu nahm das Durchschnittsgewicht der Milzen nach Infektion zu (*Daten nicht gezeigt*).

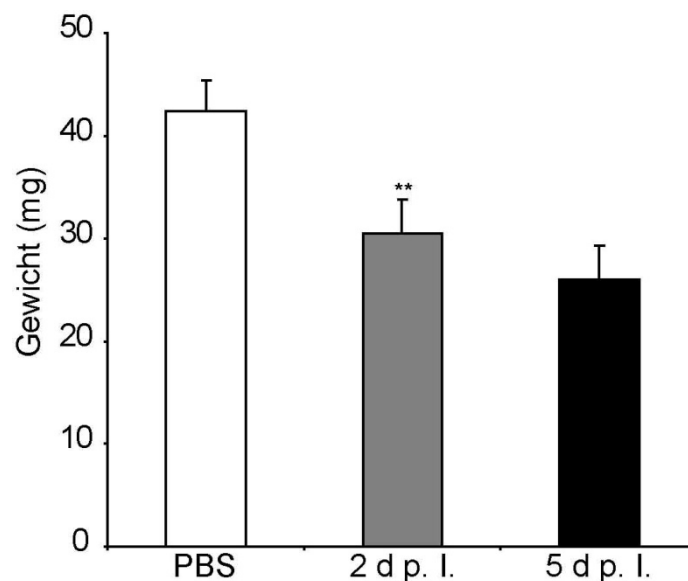


Abbildung 7: Infektion mit Vesicular Stomatitis Virus führt zu einer Thymusinvolution

Sieben Wochen alte C57/BL6 Mäuse wurden 48 Stunden (*grau*) und 120 Stunden (*schwarz*) vor Organentnahme je 10^6 *plaque forming units* des VSV systemisch infiziert. Im Vergleich zur

Kontrollgruppe ergaben sich 28 % Gewichtsreduktion 48 Stunden nach Virusinfektion, 39 % Gewichtsreduktion 120 Stunden nach Infektion. Die Balken geben die Mittelwerte \pm SEM an. $n = 5$ für jede Gruppe.

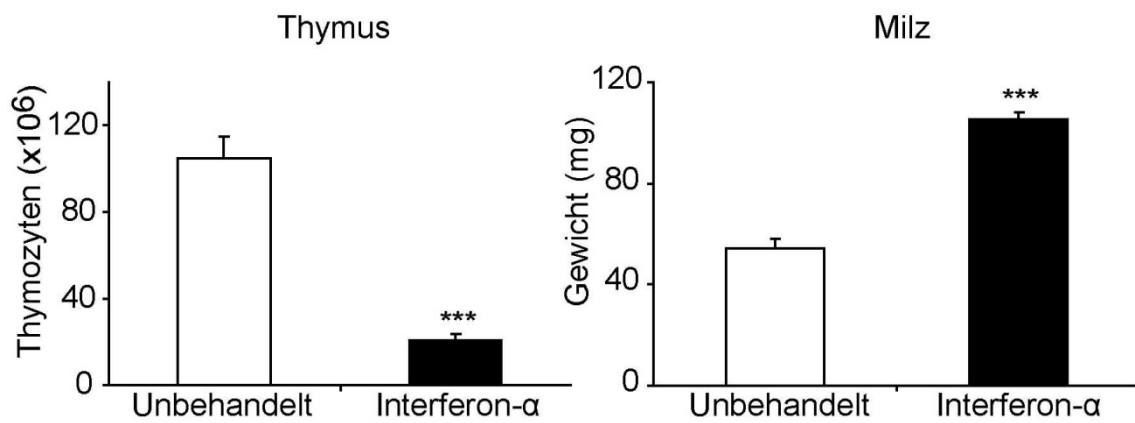
4.1.5. Behandlung mit Interferon- α führt zur Thymusinvolution

Poly(I:C) ist bekannt als starker Induktor einer Typ I Interferon Antwort. Vor allem Interferon- α wird durch die Poly(I:C) Bindung an und Aktivierung von MDA-5 und TLR3 in erhöhtem Maße gebildet. Auch VSV Infektionen führen bekanntlich zu erhöhten Interferonspiegeln. Nun sollte untersucht werden, ob eine alleinige Erhöhung des systemischen Interferon- α Spiegels oben beschriebene Veränderungen am Thymus hervorrufen kann, denn sowohl bei der Infizierung mit Poly(I:C) als auch mit VSV werden neben Interferon- α weitere Zytokine ausgeschüttet. Dazu wurde acht Wochen alten C57/BL6 Mäusen an sechs aufeinanderfolgenden Tagen im Abstand von 24 Stunden je 12 μ g rekombinantes murines Interferon- α intraperitoneal verabreicht. 24 Stunden nach der letzten Applikation wurden die Organe analysiert. Wie in *Abbildung 8 A* zu erkennen, zeigte sich schon bei makroskopischer Betrachtung eine massive Volumenreduktion des Thymus nach Interferon- α Behandlung. Das Thymusgewicht reduzierte sich signifikant ($p = 0,000052$, *Daten nicht gezeigt*) nach Interferon- α Applikationen und auch die Anzahl an Zellen im Thymus nahm drastisch ab. Bei der durchschnittlichen Anzahl an Zellen pro Thymus war eine Verminderung um 81 % zu verzeichnen (*Abbildung 8 B links*). Im Gegensatz dazu kam es nach Interferon- α Behandlung zu einer signifikanten Gewichtszunahme der Milz (*Abbildung 8 B rechts*). *Abbildung 8 C* zeigt das Durchschnittsgewicht der unbehandelten und Interferon- α -behandelten Mäuse, bei denen ein fast kontinuierlicher Gewichtsverlust zu erkennen war. Dieser starke Einfluß von Interferon- α auf die Zellularität des Thymus deckt sich mit den von uns gemachten Beobachtungen, dass IFNAR-defiziente Versuchstiere nach Applikation von Poly(I:C) keine signifikanten Veränderungen am Thymus aufweisen.

A



B



C

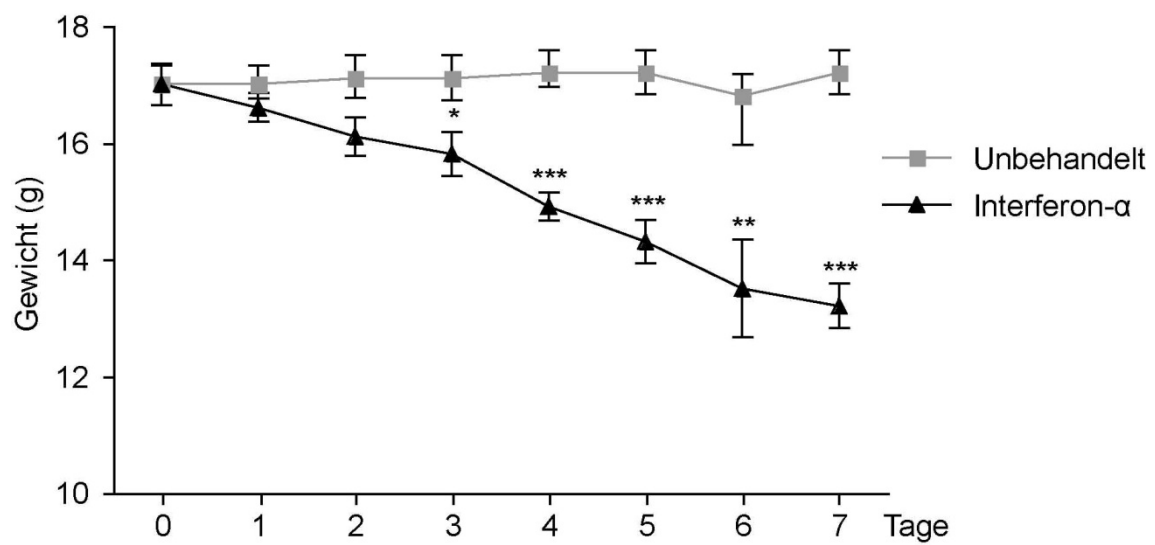


Abbildung 8: Interferon- α Behandlung hat eine Thymusinvolution und eine Verminderung der Zellularität zur Folge

A, der Thymus von unbehandelten (*oben*) und Interferon- α behandelten C57BL/6 Mäusen 24 Stunden nach der letzten von sechs im Abstand von 24 Stunden erfolgten Interferon- α Injektionen. B, Anzahl an Thymozyten (*links*) und Gewicht von Milz (*rechts*) in Milligramm (mg) 24 Stunden nach der letzten Interferon- α Gabe. Thymus und Milz stammen von denselben Mäusen wie in A. C, Gewichtskurven der Kontrollgruppe (*grau*) und Interferon- α behandelten Mäuse (*schwarz*). Die Balken geben die Mittelwerte \pm SEM an. n = 5 für jede Gruppe.

4.2. Zellverlust in Peyer Plaques durch doppelsträngige Ribonukleinsäuren

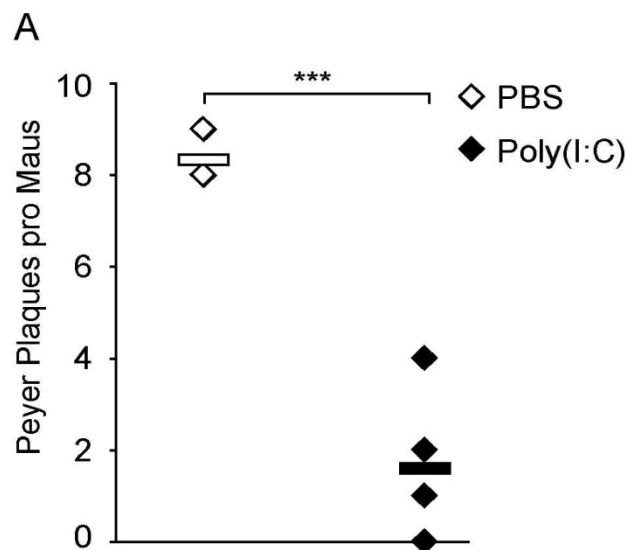
In Abschnitt 3.1 wurden ausführlich Veränderungen am Thymus nach viraler Infektion, Poly(I:C) Behandlung und systemischer Interferon- α Administration besprochen. Der Thymus stellt als primäres lymphatisches Organ, wie im Einleitungstext erläutert, eine zentrale Quelle zum Aufbau und Erhalt des peripheren Pools an T-Zellen dar. Auch zwischen Peyer Plaques und Thymus findet ein reger Informations- und Zellaustausch statt (Weissman et al. 1975). Nach Reifung im Thymus siedeln sich T-Zellen unter anderem in den parafollikulären Regionen der Peyer Plaques an, wo sie der Aufnahme von Antigenen vor allem aus dem Darmlumen dienen. Störungen dieser Zellmigration, wie sie beispielsweise durch oben beschriebene systemische virale Infektionen entstehen können, könnten daher die Funktionsfähigkeit des gastrointestinalen Immunsystems massiv beeinträchtigen und somit eine Gefahr für den gesamten Organismus darstellen. An der Funktion und den Reaktionen von Peyer Plaques nach oraler Antigengabe ist in den vergangenen Jahrzehnten intensiv geforscht worden. Hier wurde nun weiter untersucht, ob und in welcher Form eine systemische Immunaktivierung mittels Poly(I:C) Auswirkungen auf, unter anderem, Zellintegrität und Morphologie der Peyer Plaques in Mäusen hat.

4.2.1. Massive Involution der Peyer Plaques nach Behandlung mit *polyinosinic:polycytidylic acid*

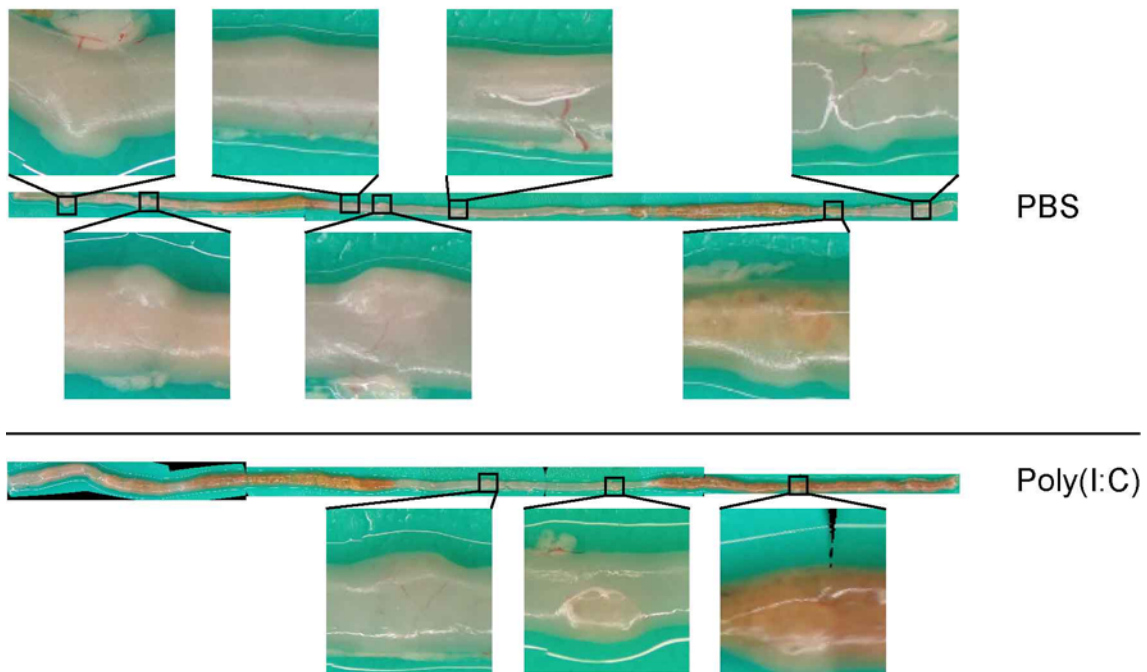
Zunächst wurde untersucht, ob die systemische Applikation des dsRNA-Analogons Poly(I:C) zu makroskopischen Veränderungen an Peyer Plaques von Mäusen *in vivo* führt. Dazu wurde Poly(I:C) anfänglich zweimal intraperitoneal appliziert und die Organe 48 Stunden nach der zweiten Gabe entnommen. Es ließen sich nach dieser Poly(I:C) Administration makroskopisch nur sehr wenige Peyer Plaques erkennen. Der

sehr konstante Durchschnittswert von etwa acht gut differenzierbaren Peyer Plaques in sechs bis zehn Wochen alten weiblichen C57/BL6 Mäusen reduzierte sich nach zweimaliger Poly(I:C) Injektion auf durchschnittlich ein bis zwei Peyer Plaques pro Individuum (*Abbildung 9 A*). Die wenigen noch auffindbaren Plaques waren zudem kleiner (ca. 1 mm lang), als jene aus der Gruppe der unbehandelten Tiere (durchschnittlich circa 2 mm lang) (*Abbildung 9 B*).

Nach diesen signifikanten Ergebnissen wurde weiter untersucht, ob sich auch zelluläre Veränderungen in Peyer Plaques Poly(I:C)-behandelter Mäuse ausmachten. Die mit einer Neubauer Zählkammer bestimmte durchschnittliche Anzahl an vitalen Zellen aus Peyer Plaques verringerte sich nach zweimaliger Injektion von Poly(I:C) um das etwa Vierfache (*Abbildung 9 C, links*). Im Vergleich dazu veränderte sich die Zellzahl in peripheren Lymphknoten nicht signifikant (*Abbildung 9 C, rechts*). Auch mesenteriale Lymphknoten und Milz erfuhren keinen Verlust an Zellen. Die Peyer Plaques wurden mit größter Sorgfalt von umgebendem Dünndarmgewebe entfernt, um möglichst wenige Zellen anderen Ursprungs zu erhalten.



B



C

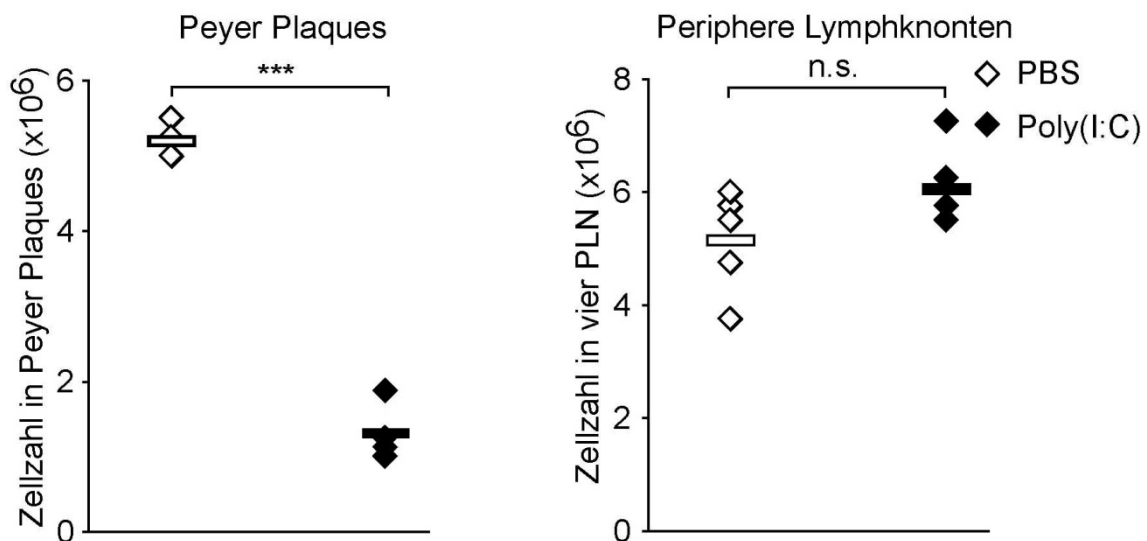


Abbildung 9: Makroskopischer Verlust von Peyer Plaques und Verminderung der Zellzahl nach systemischer Behandlung mit Poly(I:C)

A, Anzahl an makroskopisch sichtbaren Peyer Plaques von unbehandelten und Poly(I:C)-behandelten weiblichen C57BL/6 Mäusen 48 Stunden nach der letzten von zwei intraperitonealen Injektionen mit je 250 μ g Poly(I:C). Poly(I:C) wurde dabei 120 Stunden und 48 Stunden vor Organentnahme appliziert. B, Aufnahmen des Dünndarms (Pylorus bis Ileozökalklappe) in seiner Gesamtheit mit Vergrößerung der Peyer Plaques enthaltenden Darmabschnitte vor (*oben*) und nach (*unten*) zweimaliger Gabe von Poly(I:C). C, Anzahl an Zellen in Peyer Plaques (*links*) und peripheren Lymphknoten (*rechts*) nach Behandlung mit PBS (*weiß*) und Poly(I:C). Jede Raute beschreibt ein Individuum, Balken zeigen die Mittelwerte. n = 5 pro Gruppe. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens vier unabhängige Experimente.

4.2.2. Keine signifikanten Veränderungen an Peyer Plaques nach Gabe von CpG und Resiquimod

Poly(I:C) ist bekannt als synthetische dsRNA, die über Aktivierung von TLR3 und MDA-5 zur Ausschüttung verschiedener Zytokine, vor allem von Typ I Interferonen führt. CpG Oligodeoxynukleotide werden durch TLR9 erkannt und führen über dessen Stimulation auch zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Resiquimod ist unter anderem Ligand für TLR7 und TLR8 und führt ebenfalls zur Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine (Schon et al. 2008). Auch Interferon- α wird durch Resiquimod vermehrt ausgeschüttet, jedoch in geringerem Maße als bei Poly(I:C). Um zu untersuchen, ob die beobachteten Veränderungen an Peyer Plaques nach Immunstimulation auf Poly(I:C) beschränkt sind oder sich auch mit anderen Immunstimulatoren reproduzieren lassen, wurde weiblichen C57/BL6 Mäusen CpG beziehungsweise R-848 in vergleichbar hohen Dosen intraperitoneal oder subkutan verabreicht. Im selben Ansatz wurde einer weiteren Gruppe Poly(I:C) subkutan gegeben, um zu sehen, ob sich dort Unterschiede zur intraperitonealen Applikation erkennen lassen. Als Positivkontrolle wurde Poly(I:C) i.p. verabreicht, die Negativkontrolle erhielt zweimal 250 μ l PBS intraperitoneal. Es zeigte sich, dass die subkutane Administration von Poly(I:C) zu mit der i.p. Applikation vergleichbaren Veränderungen an Peyer Plaques führt, wohingegen sich bei CpG ODN und R-848 keine signifikanten Veränderungen zeigten (*Abbildung 10*). Auch die subkutane Verabreichung von CpG führte nicht zu den beschriebenen Veränderungen an Peyer Plaques.

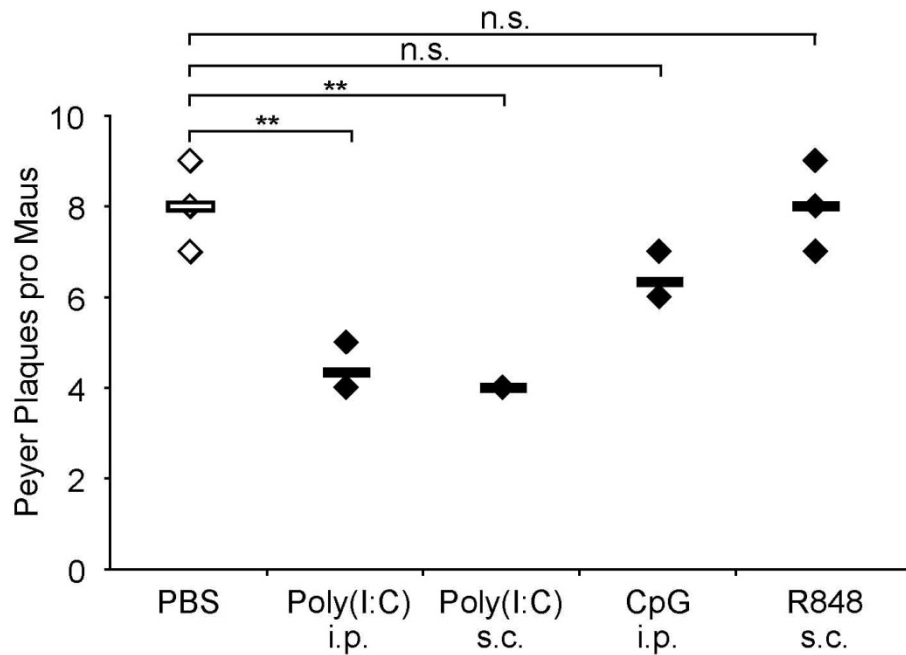


Abbildung 10: Keine signifikanten Veränderungen an Peyer Plaques nach Gabe von CpG und R-848

Anzahl an Peyer Plaques pro Maus vor (*weiß*) und nach der Gabe unterschiedlicher Liganden (*schwarz*). Auch die zweimalige Gabe von 250 µg Poly(I:C) subkutan (s.c.) führt wie die i.p. Applikation zum makroskopischen Verlust von Peyer Plaques. Die zweimalige i.p. Gabe von 50 µg CpG ODN sowie die zweimalige s.c. Gabe von 30 µg R-848 führen zu keinen signifikanten Veränderungen der makroskopisch erkennbaren Anzahl an Peyer Plaques. Jede Raute beschreibt ein Individuum, die Balken zeigen die Mittelwerte. n = 3 pro Gruppe.

4.2.3. Zellverlust in unterschiedlichen Zellpopulationen nach Behandlung mit *polyinosinic:polycytidylic acid*

Bisher wurde gezeigt, dass die *in vivo* Gabe von Poly(I:C) zum generellen Zellverlust in Peyer Plaques führt. Nun sollte durchflusszytometrisch untersucht werden, welche Zellpopulationen von dem Zellverlust in welchem Maße betroffen sind. *Abbildung 11* zeigt, dass nach Poly(I:C) Behandlung fast alle untersuchten Zellpopulationen der Peyer Plaques signifikant an Zellzahl abnehmen (*oben links*). Vor allem B-Zellen, die den Großteil des Zellpools in Peyer Plaques darstellen, nehmen drastisch in ihrer absoluten Zellzahl ab. Im Vergleich dazu zeigte sich bei peripheren Lymphknoten eher eine Zunahme der Zellzahl. Das untere Panel zeigt deutlich, dass auch prozentual vor allem die B-Zellen der Peyer Plaques nach Poly(I:C) Behandlung abnehmen (*unten links*), wohingegen sie in peripheren Lymphknoten zunehmen (*unten rechts*).

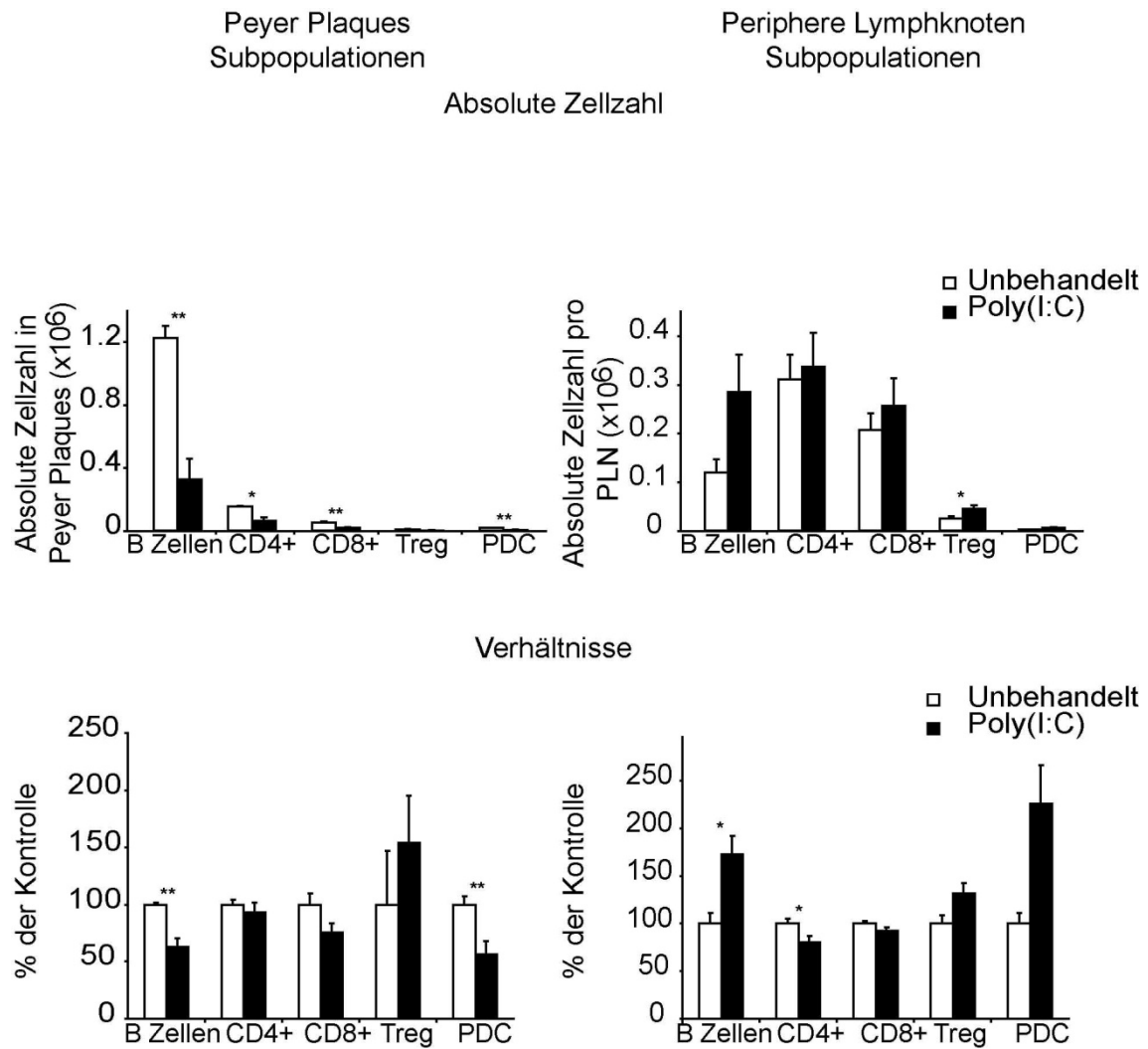


Abbildung 11: Zellverlust in unterschiedlichen Subpopulationen der Peyer Plaques nach Behandlung mit Poly(I:C)

Die obere Reihe zeigt die durchflusszytometrisch bestimmte Zellzahl unterschiedlicher Leukozytenpopulationen in Peyer Plaques (*links*) und peripheren Lymphknoten (*rechts*) ohne (*weiß*) und nach (*schwarz*) einer einmaligen Behandlung mit 250 µg Poly(I:C) 48 Stunden nach der Injektion. Die untere Reihe zeigt die prozentualen Veränderungen der unterschiedlichen Populationen nach Gabe von Poly(I:C) im Vergleich zur Gruppe ohne Behandlung. Die Balken geben die Mittelwerte ± SEM an. n = 5 für jede Gruppe.

4.2.4. Histomorphologische Veränderungen in Peyer Plaques nach Behandlung mit *polyinosinic:polycytidylic acid*

Nachdem gezeigt wurde, dass die systemische Administration von Poly(I:C) zu makroskopischen Veränderungen und zu Zellverlusten in unterschiedlichen Subpopulationen der Peyer Plaques führt, wurde auf mikroanatomischer Ebene untersucht, ob sich Veränderungen nachweisen lassen. Dazu wurden nach Fixierung in Formaldehyd Paraffinschnitte von Peyer Plaques mit angrenzendem

Dünndarmgewebe von unbehandelten und mit Poly(I:C)-behandelten Tieren angefertigt. Diese wurden anschließend mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. Schon in niedriger Vergrößerung ließ sich eine Verkleinerung und Abflachung der Peyer Plaques im Längsschnitt erkennen. Der klassische, in das Darmlumen hineinragende Dom war ebenfalls nicht mehr zu erkennen (*Abbildung 12 A*). Bei stärkerer Vergrößerung waren die Unterschiede der beiden Gruppen noch deutlicher zu erkennen. Der typische Aufbau von Peyer Plaques mit seinen Lymphfollikeln, interfollikulären Regionen und Dom mit Domepithel war nicht mehr klar zu erkennen. Vor allem die an B-Zellen reichen Lymphfollikel schienen sich in ihrem Volumen deutlich zu reduzieren, und die sonst klare Strukturierung in Medulla, Kortex und Korona war nicht mehr zu erkennen (*Abbildung 12 B*).

A



B

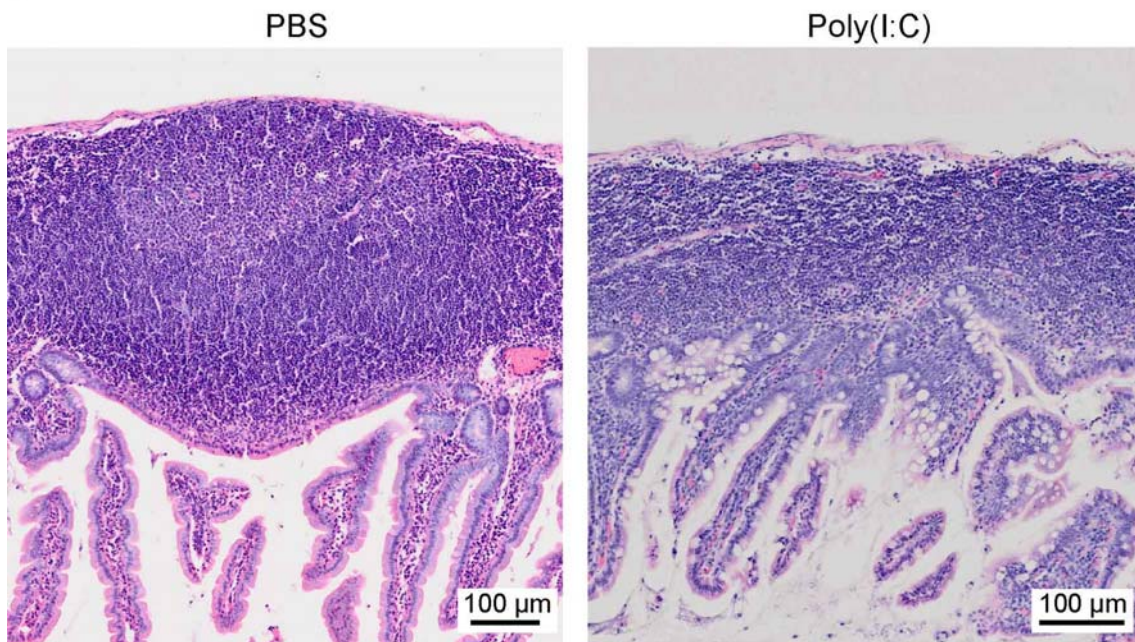


Abbildung 12: Histomorphologische Veränderungen in Peyer Plaques nach Poly(I:C)

HE gefärbte, in Paraffin gebettete Schnitte von C57BL/6 Mäusen 48 Stunden nach der letzten von zwei Poly(I:C) Injektionen. A, Sequenzen von Längsschnitten durch Peyer Plaques mit angrenzenden Darmabschnitten von unbehandelten (*links*) und Poly(I:C) behandelten (*rechts*) Mäusen. B, die 40-fache Vergrößerung zeigt histomorphologische Veränderungen der Peyer Plaques nach Behandlung mit Poly(I:C). Der Gesamtdurchmesser ist reduziert. Das Darmlumen der behandelten Maus ist reich an circa 20 µm großen Vesikeln. n = 3 für jede Gruppe.

4.2.5. Systemische Infektion mit dem *vesicular stomatitis virus* führt zum Zellverlust in Peyer Plaques

Poly(I:C) wird in der Forschung als Substanz eingesetzt, um virale Infektionen und deren Auswirkungen auf den Organismus zu imitieren. Deshalb wurde nun untersucht, ob sich die mit der synthetischen, doppelsträngigen RNA gezeigten Veränderungen an Peyer Plaques auch mit einem in der Natur vorkommenden Virus reproduzieren lassen. Hierzu wurden acht Wochen alte C57/BL6 Mäuse zwei Tage (48 Stunden) sowie fünf Tage (120 Stunden) vor Organentnahme mit je 10^6 *plaque forming units* des VSV systemisch infiziert. Die durchschnittliche Anzahl an erkennbaren Peyer Plaques verringerte sich 48 Stunden nach Infektion um etwa 21 % (signifikant mit $p = 0,0134$) und 120 Stunden nach Infektion um circa 25 % (signifikant mit $p = 0,0022$). Nach Anfertigen von Einzelzellsuspensionen aus Peyer Plaques und Auszählen der Zellen zeigten sich sowohl 48 als auch 120 Stunden nach systemischer Infektion mit VSV signifikante Verringerungen der Zellzahl in Peyer Plaques (*Abbildung 13*).

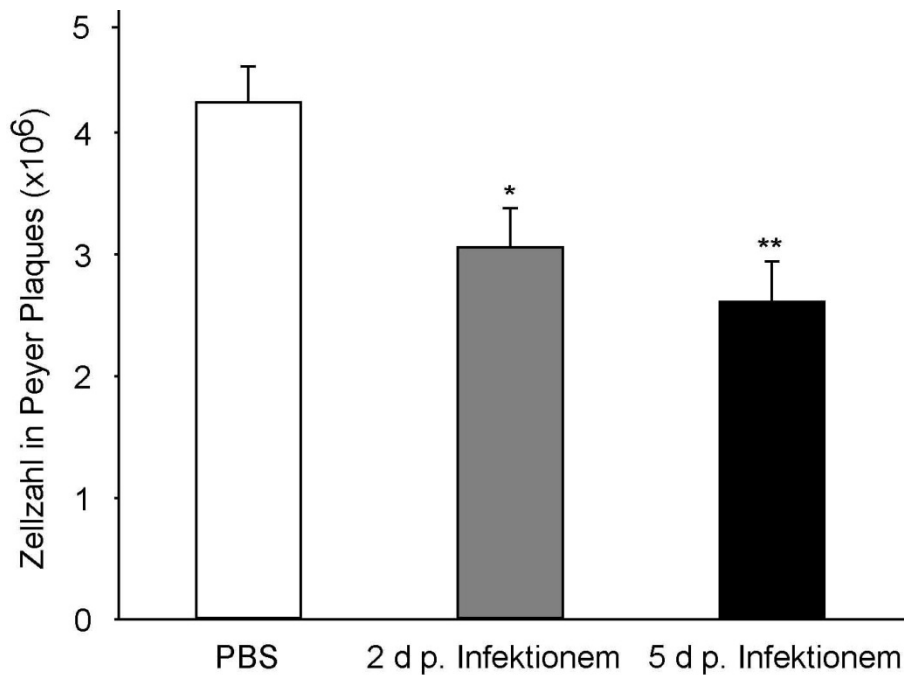


Abbildung 13: Systemische Infektion mit dem *vesicular stomatitis virus* führt zum Zellverlust in Peyer Plaques

Durchschnittliche Anzahl an Zellen in Peyer Plaques von weiblichen C57/BL6 Mäusen ohne (*weiß*), 48 Stunden (*grau*) und 120 Stunden (*schwarz*) nach Infektion mit VSV. PBS: $4,24 \times 10^6$ Zellen; 48 Stunden nach Infektion: $3,05 \times 10^6$ Zellen; 120 Stunden nach Infektion: $2,6 \times 10^6$ Zellen pro Individuum. Die Balken geben die Mittelwerte \pm SEM an. $n = 5$ für jede Gruppe.

4.2.6. Veränderungen an Peyer Plaques sind abhängig vom Interferon- α Rezeptor

Über die Aktivierung von TLR3 und MDA-5 vermittelt Poly(I:C) die Produktion unterschiedlicher Zytokine, vor allem Typ I Interferone wie Interferon- α und Interferon- β . Um herauszufinden, ob die gezeigten Auswirkungen auf Peyer Plaques durch die Effekte von Interferon- α bedingt sind, wurde ein Modell mit Interferon- α -Rezeptor defizienten (IFNAR^{-/-}) Mäusen verwendet. So kann zwar durch Immunstimulation immer noch Interferon- α produziert werden, doch können seine Effekte durch das Fehlen eines zellulären Rezeptors nicht mehr hervorgerufen werden. Dazu wurde Poly(I:C) zweimal in Wildtyp und IFNAR^{-/-} Mäusen appliziert. Die Kontrolltiere erhielten PBS i.p.. 48 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Organe entnommen und die Zellzahl in Peyer Plaques bestimmt. Wie zu erwarten reduzierte sich die Zellzahl in den WT Tieren massiv nach Gabe von Poly(I:C). Dem gegenüber zeigte sich in den IFNAR^{-/-} Mäusen keine Veränderungen der Zellzahl in

Peyer Plaques nach Applikation von Poly(I:C) (*Abbildung 14*). Auch die makroskopisch erkennbare Anzahl an Peyer Plaques verringert sich in der Wildtyp Gruppe signifikant ($p = 0,0000042$), nicht jedoch in der IFNAR^{-/-} Gruppe ($p = 0,347$) (*Daten nicht gezeigt*). Dieser Versuch bewies, dass die nach systemischer Immunaktivierung beobachteten Effekte abhängig von Typ I Interferonen sind.

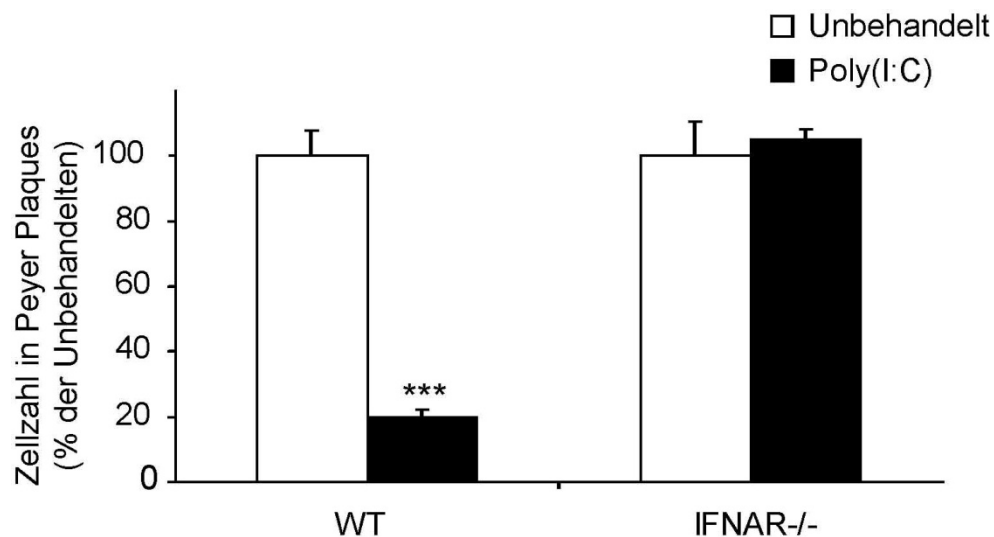


Abbildung 14: Die Veränderungen an Peyer Plaques nach Poly(I:C) Behandlung sind abhängig vom Interferon- α Rezeptor

Proportionen der Anzahl an Zellen in Peyer Plaques von Wildtyp (WT) und IFNAR^{-/-} Mäusen. Signifikante Reduktion der Zellzahl in der Wildtyp Gruppe auf 20% des Ausgangswertes nach Poly(I:C). Veränderungen in der Gruppe der IFNAR^{-/-} Versuchstiere nicht signifikant. Die Balken geben die Mittelwerte \pm SEM an. $n = 5$ für jede Gruppe.

4.2.7. Zellverlust in Peyer Plaques durch Interferon- α

Infektionen mit Viren wie beispielsweise dem *vesicular stomatitis virus* oder andere Wege der Immunaktivierung wie mit Poly(I:C) führen schon kurze Zeit nach ihrer Inokulation zu erhöhten Serumspiegeln verschiedener Zytokine (Isaacs et al. 1961, Greene et al. 1978, Trinchieri et al. 2007). Wie in Abschnitt 3.2.6 gezeigt werden konnte, ist für die zellulären und strukturellen Veränderungen an Peyer Plaques Interferon- α von essentieller Bedeutung. Nach den vorausgegangenen Versuchen mit IFNAR^{-/-} Mäusen stellte sich nun die Frage, ob eine alleinige Erhöhung des Serumspiegels von Interferon- α ausreicht, um die gezeigten Effekte an Peyer Plaques hervorzurufen, oder ob hierzu noch andere Zytokine nötig sind. Dazu wurde sieben Wochen alten C57/BL6 Mäusen an sechs aufeinander folgenden Tagen im Abstand von 24 Stunden Interferon- α in einer Menge von 12 μ g pro Applikation intraperitoneal

verabreicht. Wie auch bei den Versuchen, die zur Aufklärung der Thymusinvolution nach Immunstimulation durchgeführt wurden, verloren die mit Interferon- α stimulierten Tiere im Behandlungszeitraum kontinuierlich an Gewicht (*siehe* 3.1.5). 24 Stunden nach Beendigung der Applikationsreihe wurden die Mäuse euthanasiert und die Organe entnommen. Auf dem Dünndarm reduzierte sich die makroskopisch erkennbare Anzahl an Peyer Plaques nach Interferon- α Gabe signifikant ($p = 0,00073$) und auch die Zellzahl war deutlich dezimiert. Hier reduzierte sich die durchschnittliche Zellzahl auf 1/3 nach Behandlung mit Interferon- α , verglichen mit der Gruppe der unbehandelten Versuchstiere (*Abbildung 15 links*). Im Gegensatz dazu erfuhr die Milz (*Abbildung 15 rechts*) einen signifikanten Zugewinn an Masse.

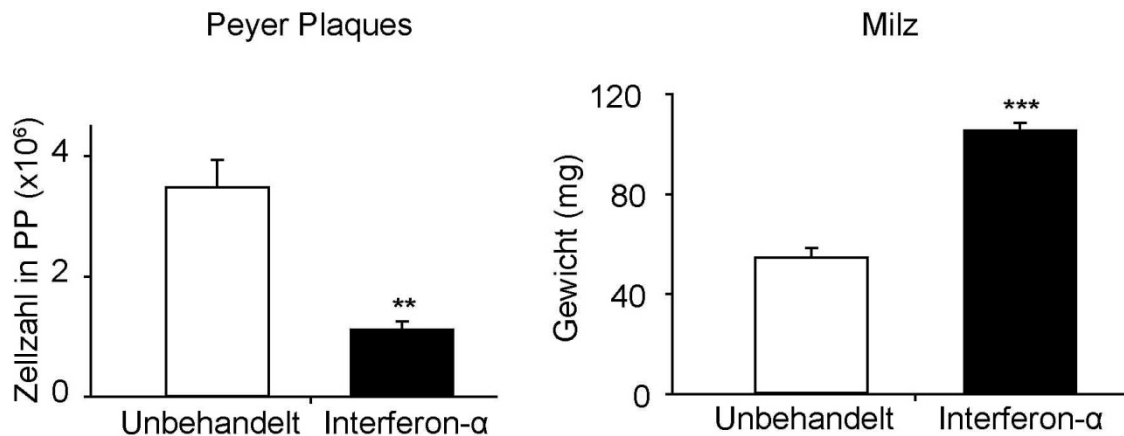


Abbildung 15: Zellverlust in Peyer Plaques durch Interferon- α

Anzahl an Zellen in Peyer Plaques (*links*) und Gewicht von Milz (*rechts*) in Milligramm (mg) 24 Stunden nach der letzten von sechs Interferon- α Gaben. Die durchschnittliche Zellzahl in Peyer Plaques reduzierte sich nach Poly(I:C) von $3,48 \times 10^6$ Zellen in Peyer Plaques pro Individuum auf $1,10 \times 10^6$ Zellen. Die Balken geben die Mittelwerte \pm SEM an. $n = 5$ für jede Gruppe.

4.2.8. Regeneration der Peyer Plaques nach Beendigung der Immunstimulation

Die Applikation von Poly(I:C) führt schon nach kurzer Zeit zur Erhöhung der Serumspiegel von Interferon- α , die jedoch auch rasch nach Absetzen des Stimulus wieder abfallen (Rosztoczy 1986). Da gezeigte Veränderungen von erhöhten Interferon- α Spiegeln abhängen und diese als alleinige Zytokinerhöhung auch ausreichen, sollte untersucht werden, ob die beobachteten zellulären und strukturellen Veränderungen an Peyer Plaques nach Absetzen des Stimulus beziehungsweise Abfallen der Interferon- α Spiegel permanent erhalten bleiben, oder sich die

Lymphstrukturen regenerieren. Dazu wurden C57/BL6 Mäuse zweimal mit Poly(I:C) behandelt. Bei der ersten Gruppe wurden die Organe wie bei den meisten Versuchen 48 Stunden nach der letzten Applikation untersucht und zeigten die beschriebenen Veränderungen. Die zweite Gruppe blieb nach der letzten Injektion für 19 Tage (456 Stunden) unter Poly(I:C) Karenz. Bei makroskopischer Betrachtung der Peyer Plaques dieser Gruppe fielen keine Unterschiede zur Kontrollgruppe auf (*Daten nicht gezeigt*). Die Auszählung der Zellen ergab, dass sich die durchschnittliche Zellzahl 19 Tage nach dem letzten Poly(I:C) Stimulus nicht signifikant von der der Kontrollgruppe unterschied. Der Unterschied in Zellzahl zwischen den mit Poly(I:C)-behandelten Gruppen war signifikant (*Abbildung 16*).

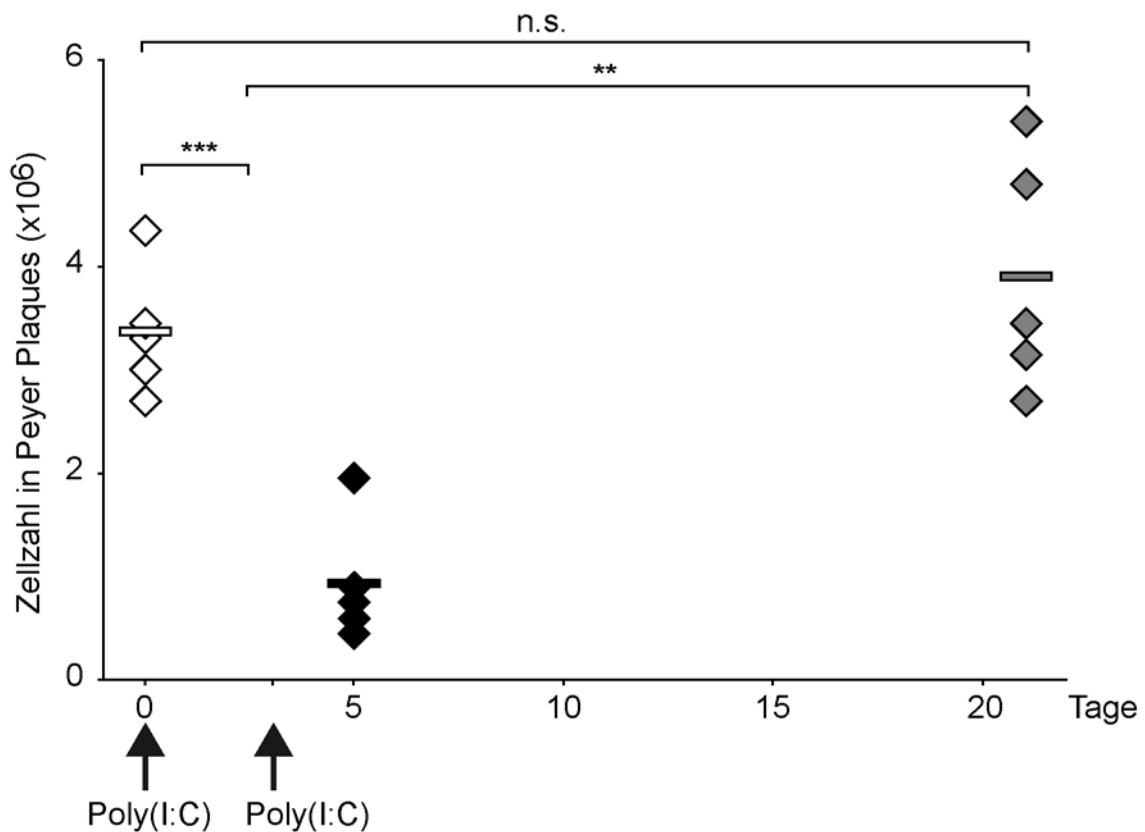


Abbildung 16: Poly(I:C)-vermittelte Veränderungen an Peyer Plaques sind reversibel

Veränderung der Zellzahl in Peyer Plaques nach zwei intraperitonealen Injektionen von je 250 µg (1 mg/ml) Poly(I:C) in C57BL/6 Mäuse. PBS: *weiß*; 48 Stunden nach letzter Poly(I:C) Injektion: *schwarz*; 19 Tage nach der letzten Poly(I:C) Injektion: *grau*. Jede Raute repräsentiert ein Individuum. Die Balken geben die Mittelwerte an. n = 5 für jede Gruppe.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine systemische Infektion mit dem *vesicular stomatitis virus*, die Behandlung mit der Immunstimulanz Poly(I:C) und die alleinige Gabe von Interferon- α über Aktivierung des Interferon- α Rezeptors zu zellulären, makro- sowie mikroanatomischen Veränderungen an murinen Peyer Plaques führt. Diese Veränderungen sind vollständig reversibel.

5. Diskussion

5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung dsRNA-erkennender Immunrezeptoren durch systemische Infektionen mit dem *vesicular stomatitis virus* und dem Immunstimulator Poly(I:C) zu massiven Veränderungen an Thymus und Peyer Plaques führt. Diese werden durch das auch in klinischer Therapie eingesetzte Interferon- α hervorgerufen.

5.1.1. Temporäre Thymusinvolution nach Aktivierung des angeborenen Immunsystems

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die *in vivo* Applikation von Poly(I:C) zu einer transienten Erhöhung der Apoptoserate und einer massiven Reduktion der Proliferation von Thymozyten führt. Wir konnten Ergebnisse von Démoulins reproduzieren, die ergaben, dass die Gabe von Poly(I:C) auch zu einer signifikant reduzierten Emigration von *recent thymic emigrants* in sekundär lymphatische Organe führt (Démoulins et al. 2008). Anz und Kollegen zeigten zudem, dass die mikroanatomische Struktur des Thymus nach Poly(I:C) Gabe nicht zerstört wird und das Organ zehn Tage nach Behandlung wieder normales Gewicht und Architektur aufweist. Diese Ergebnisse konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit reproduziert werden.

Die Effekte von Poly(I:C) auf den Thymus werden durch Interferon- α vermittelt, da die alleinige Applikation von rekombinantem Interferon- α zu den dokumentierten Ergebnissen führt und Anz und Kollegen nachwiesen, dass Tiere, die keinen Rezeptor für Interferon- α besitzen auch keine Alterationen am Thymus aufzeigen.

Diese Veränderungen sind nicht auf ein artifizielles Modell beschränkt. In unserer Untersuchung konnten wir aufzeigen, dass Infektionen mit dem dsRNA Virus *vesicular stomatitis virus* neben Reoviridae (Onodera et al. 1991) und anderen Viren (White et al. 1973; Chino et al. 1979), zu einer Thymusinvolution führt.

5.1.2. Systemische Virusinfektionen führen zu massiven Veränderungen an Peyer Plaques

Nachdem wir belegt haben, dass Virusinfektionen über die Ausschüttung von Interferon- α zu einer eindrucklichen Thymusinvolution führen, betrachteten wir sekundär lymphatisches Gewebe auf Veränderungen, da der Thymus durch Abgabe von unter anderem naiven T-Zellen (RTE) maßgeblich an der Aufrechterhaltung des peripheren T-Zell *pools* beteiligt ist (Boursalian et al. 2004)

In unserer Untersuchung konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass die nicht-gastrointestinale Infektion mit dem *vesicular stomatitis virus* und die systemische Applikation von Poly(I:C) zu einem massiven Verlust an T und B-Zellen in Peyer Plaques führt, der mit einem Verlust der makro- und mikroanatomischen Struktur einhergeht. Andere sekundäre lymphatische Organe wie mesenteriale Lymphknoten, periphere Lymphknoten und Milz hingegen reagierten, wie zu erwarten war, mit Proliferation, die zu einer Erhöhung von Zellularität und Gesamtmasse dieser Organe führte.

Durch Versuche mit IFNAR^{-/-} Mäusen konnten wir bestätigen, dass die Veränderungen an Peyer Plaques durch Interferon- α hervorgerufen werden. Auch konnte die alleinige Gabe von Interferon- α die Veränderungen an Peyer Plaques hervorrufen. Andere potente Aktivator des angeborenen Immunsystems wie CpG und Resiquimod konnten diese dosisabhängigen Effekte nur in stark reduziertem Maße hervorrufen, was sehr wahrscheinlich an der geringeren Ausschüttung von Interferon- α im Vergleich zur Behandlung mit Poly(I:C) liegt (Vasilakos et al. 2000).

Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass die Auswirkungen erhöhter Interferon- α Spiegel auf Peyer Plaques temporär sind und diese sich bald nach Normalisierung der Zytokinkonzentration in Zellularität und Struktur regenerieren.

5.2. Einordnung der Ergebnisse im Kontext der Literatur

5.2.1. Thymusinvolution vermittelt durch *thymic epithelial cells* oder dendritische Zellen

Neben T-Vorläuferzellen befinden sich im Thymus weitere Zellen hämatopoetischen Ursprungs wie plasmazytoide dendritische Zellen (pDC), Makrophagen und B-Zellen (Vandenabeele et al. 2001). Okada und Kollegen konnten zeigen, dass pDC im Thymus hohe Mengen an Interferon- α nach Stimulation mit TLR Liganden bilden, was das inflammatorische Milieu im Thymus neben den systemisch erhöhten Zytokinspiegeln intensivieren könnte (Okada et al. 2003). Versuche mit isolierten pDC zusammen mit Thymozyten Progenitorzellen ($CD34^+CD1a^-$) in Co-Kultur zeigten, dass pDC nach viraler Stimulation hohe Mengen an Typ I Interferonen ausschütten und die Entwicklung der Progenitorzellen unterdrücken (Gurney et al. 2004; Schmidlin et al. 2006). Eine Suppression und geringere Zellularität von Thymus und Knochenmark neonataler Mäuse nach Behandlung mit einem IFN- $\alpha 2/\alpha 1$ Hybridmolekül konnten zuvor schon Lin und Kollegen nachweisen (Lin et al. 1998).

Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass Interferon- α nicht direkt auf Thymozyten wirkt, um die gezeigten Veränderungen hervorzurufen (Anz et al. 2009). Wir verwendeten $CD4-Cre^{+/-}IFNAR^{flx/flx}$ transgene Mäuse, bei denen lediglich die T-Zellen keinen Rezeptor für Typ I Interferon (Interferon- α , Interferon- β) haben. Bei den sich entwickelnden $CD4-Cre^{+/-}IFNAR^{flx/flx}$ Versuchstieren wird direkt nach der ersten Ausprägung des CD4 Antigens der Rezeptor für Interferon- α unwiderruflich gelöscht. So können diese Tiere zwar weiterhin über beispielsweise *Pattern Recognition Rezeptoren* aktiviert werden und Interferone produzieren, doch kann weder selbst gebildetes noch fremdes Interferon- α auf T-Zellen wirken (Kamphuis et al. 2006). Hier führte die Applikation von Poly(I:C) zu vergleichbaren Veränderungen im Thymus wie in Wildtyp Mäusen. Gleiches konnten wir bei Mäusen zeigen, deren B-Zellen für den Rezeptor von Typ I Interferon defizient sind. Lediglich die Fraktion der doppelt negativen Thymozyten könnte direkt durch Typ I Interferon beeinflusst werden, da sie noch kein CD4 Antigen ausbildeten und folglich auch noch ihren IFNAR besitzen.

Okada und Kollegen zeigten, dass vor allem die Stimulation von TLR9 mit CpG zu einer hohen Interferon- α Produktion durch pDC im Thymus führt (Okada et al. 2003). Neben oben Genanntem konnten wir nachweisen, dass die alleinige Interferon- α Gabe an Wildtypmäuse ausreicht, die beschriebenen Effekte hervorzurufen. Jedoch führte im Gegensatz zu Poly(I:C) die Gabe von CpG zu wesentlich geringeren Alterationen. Dies legt nahe, dass eine weitere Zellpopulation an der Vermittlung dieser Effekte beteiligt ist.

Thymic epithelial cells stellen die größte Population an Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs im Thymus dar, sind in Kortex und Medulla in engem Kontakt mit Thymozyten und spielen eine entscheidende Rolle in deren Entwicklung und Proliferation (Anderson et al. 1996; Zamisch et al. 2005). Vidalain und Kollegen zeigten, dass sie in der Lage sind, durch Stimulation mit Poly(I:C) Typ I Interferone zu bilden (Vidalain et al. 2002). Darüber hinaus reagieren *thymic epithelial cells* auf Exposition gegenüber Interferon- α mit Veränderungen in Phänotyp und Funktion, was *in vitro* unter anderem zu einer Inhibierung der Proliferation von Thymozyten führt (Schmidlin et al. 2006). Wir konnten zeigen, dass die Gabe von Poly(I:C) zu einer reduzierten Proliferation von Thymozyten führt und die Veränderungen im Thymus nicht durch die direkte Wirkung von Interferon- α auf Thymozyten hervorgerufen werden. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass Interferon- α auf *thymic epithelial cells* wirkt, ihre Funktion verändert und schließlich die direkte Interaktion von *thymic epithelial cells* mit Thymozyten die gezeigten Veränderungen hervorruft.

5.2.2. Mechanismen der erniedrigten Zellularität in Peyer Plaques nach Erhöhung der systemischen Interferon- α Spiegel

5.2.2.1. Direkter oder indirekter Effekt von Interferon- α auf die Peyer Plaque Subpopulationen

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die intraperitoneale Gabe von Interferon- α zu massiv verringerten Zellzahlen in Peyer Plaques führt. Versuche mit IFNAR^{-/-} Mäusen zeigten, dass das Zytokin der zentrale Mediator dieser Veränderungen ist. Sowohl T und B-Zellen als auch regulatorische T-Zellen, Makrophagen und periphere dendritische Zellen in Peyer Plaques besitzen Typ I

Interferon Rezeptoren. Dendritische Zellen sind die dominierenden Interferon- α Produzenten nach oraler Verabreichung von Viren in Peyer Plaques (Johansson et al. 2007) und produzieren auch in Reinkultur auf Stimulation mit dsRNA hohe Mengen des Interferons (Deal et al. 2010).

So ist es möglich, dass Interferon- α direkt auf die betroffenen Zellpopulationen wirkt und Emigration, Apoptose oder verminderte Proliferation vermittelt. Andererseits könnte es – wie unter 4.2.1 diskutiert – beispielsweise dendritische Zellen in ihrer Funktion so beeinflussen, dass sie auf sich und die anderen Populationen wirken und die Veränderungen hervorrufen.

Auch gastrointestinale Infektionen führen zur Produktion von Typ I Interferon durch dendritische Zellen in Peyer Plaques, doch hier kommt es zur Proliferation und Differenzierung von T und B-Zellen in Peyer Plaques. Kelsall und Kollegen zeigten, dass der subepitheliale Dom und die Interfollikularregion von Peyer Plaques zwei in Phänotyp und Funktion unterschiedliche Populationen dendritischer Zellen beherbergen (Kelsall et al. 1996; Iwasaki et al. 1999). So könnte die Aufnahme intestinalen Antigens durch CD11b⁺/CD8 α ⁻ DC im subepithelialen Dom (Alpan et al. 2001) die T- und B-Zell Proliferation in Peyer Plaques hervorrufen. Dagegen könnte systemisch verabreichtes Antigen lediglich CD11b⁻/CD8 α ⁺ DC aus der Interfollikularregion aktivieren und deren Interaktion mit T und B-Zellen Reaktionen hervorrufen, die zu einem Zellverlust führen. Weitere Versuche mit transgenen Mäusen, die selektive IFNAR^{-/-} Subpopulationen besitzen, stellen eine Möglichkeit zur Lösung dieser ungeklärten Frage dar.

5.2.2.2. Quo vadis? Ursachen verminderter Zellularität in Peyer Plaques

Verminderte Immigration und Proliferation sowie erhöhte Emigration und Apoptose stellen mögliche Ursachen dar, die zur erniedrigten Zellzahl in Peyer Plaques nach systemischer Exposition gegenüber dsRNA beziehungsweise Interferon- α führen.

5.2.2.2.1. Erniedrigte Immigration in Peyer Plaques

Der Thymus ist essentiell für die Population sekundär lymphatischer Organe (Milz, Lymphknoten, Peyer Plaques) mit T-Zellen. Detaillierte *in vivo* Studien zu Emigration

von Zellen aus dem Thymus in sekundär lymphatische Organe von Scollay und Kollegen zeigten, dass in 5,5 Wochen alten Mäusen durchschnittlich $4,7 \text{ FITC}^+$ *recent thymic emigrants* pro Stunde pro 1×10^5 Zellen in Peyer Plaques migrieren (verglichen mit 34,0 in Milz) (Scollay et al. 1980). Démoulins und Kollegen zeigten eine reduzierte Emigration von Thymozyten durch erniedrigte Zellularität nach Applikation von Poly(I:C) (Demoulins et al. 2008). Zudem führt Interferon- α zur Expression von CD69 auf Thymozyten, was ihre Emigration aus dem Thymus blockiert (Feng et al. 2002; Shiow et al. 2006).

In den meisten Versuchen applizierten wir Poly(I:C) 120 und 48 Stunden vor Entnahme der Peyer Plaques. Basierend auf den Erkenntnissen von Scollay und Kollegen kann dieser Prozess somit zu um 0,6 % (beziehungsweise circa 28×10^3 Zellen) erniedrigten Zellzahlen in Peyer Plaques bei einem Stopp der Emigration 120 Stunden vor Organentnahme führen. Zwar sahen wir, dass fünf Tage nach Thymektomie die Gesamtzellzahl in Peyer Plaques um 47 % sank, doch zeigte sich dies in allen Zellpopulationen (z. B. 42 % in B-Zellen). Auch Milz (29 %) und periphere Lymphknoten (32 %) verloren stark an Zellularität. Hierfür sind neben einem Stopp der Emigration von Zellen aus dem Thymus wahrscheinlich andere durch die Thymektomie induzierte Reaktionen des Organismus mitverantwortlich.

Um aus dem Blutstrom in das Gewebe der Peyer Plaques zu gelangen, binden migrierende Lymphozyten an sogenannte *high endothelial venules*. Hierfür sind *homing* Moleküle notwendig. So findet sich auf migrierenden Lymphozyten das Integrin $\alpha_4\beta_7$, welches an *mucosal addressin cellular adhesion molecule-1* (MAdCAM-1) der *high endothelial venules* bindet und den Zellen die Möglichkeit zur Emigration in Peyer Plaques bietet (Streeter et al. 1988; Berlin et al. 1993). Eine Runterregulation von $\alpha_4\beta_7$, *vascular cell adhesion molecule 1* und weiteren *homing* Molekülen nach intraperitonealer Gabe von Poly(I:C) stellt eine weitere mögliche Ursache für die geringere Zellularität in Peyer Plaques nach Poly(I:C) Gabe dar.

5.2.2.2.2. Apoptose und verminderte Proliferation

Fuertes und Kollegen zeigten 2011, dass die systemische Gabe von Poly(I:C) zur massiven Apoptose dendritischer Zellen in der Milz führt. Interferon- α ist hierfür der zentrale Mediator, da es notwendig ist und auch seine alleinige Gabe ausreicht. Zehn bis 20 Stunden nach Gabe von Poly(I:C) waren die DC stimuliert (Expression von

CD40, CD80 und CD86), zwischen 40 und 100 Stunden *post infectionem* in ihrer Menge auf unter 10 % reduziert und 130 Stunden nach Verabreichung von Poly(I:C) fast wieder auf ihrem Ausgangsniveau (Fuentes Marraco et al. 2011). Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit gezeigten zellulären Veränderungen in Peyer Plaques DC. Da der Phänotyp der von Fuentes und Kollegen untersuchten DC ($CD11b^-/CD8\alpha^+$ und $CD11b^+/CD8\alpha^-$) dem von Peyer Plaque DC (Iwasaki et al. 1999) entspricht, ist es als sehr wahrscheinlich anzunehmen, dass die systemische Gabe von Poly(I:C) zu Apoptose dendritischer Zellen in Peyer Plaques führt.

Neben einer reduzierten Aktivierung von T und B-Zellen durch DC, könnten Typ I Interferone und Poly(I:C) direkt auf diese Zellen wirken und Apoptose in frühen Stadien der Infektion hervorrufen. Das Team um Jonathan Sprent zeigte intensive Proliferation von T-Zellen ($CD8^+$ und $CD4^+$) nach *in vivo* Gabe von Interferon- α in Milz und Lymphknoten, die schon nach einem Tag zu erkennen war (Tough et al. 1996). Doch liegen bis dato noch keine Daten für Zellen aus Peyer Plaques vor.

Typ I und Typ II Interferone haben vielfältigste Funktionen und Auswirkungen auf den Organismus und seine Zellen (Trinchieri et al. 2010). Neben autokrinen und extrinsischen antiviralen Effekten vermitteln Interferone antizelluläre Effekte durch Modulation von Zellfunktion. Neben Zelldifferenzierung, Apoptose, Autophagie und Migration inhibieren Interferone die Zellproliferation (Bekisz et al. 2010; Mattei et al. 2010). Kürzlich konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die gastrointestinale Infektion mit Rotaviren zur Proliferation von DC in Peyer Plaques führt (Lopez-Guerrero et al. 2010). Dies ist auch nachvollziehbar, da Peyer Plaques die effektivste immunologische Barriere im Dünndarm bei viralen gastrointestinalen Infektionen darstellen und DC die potentesten Typ I Interferon Produzenten sowie Lymphozytenaktivatoren darstellen. Jedoch könnten die von Bekisz und Kollegen gezeigten Vorgänge dazu führen, dass bei nicht-gastrointestinalen, systemischen Infektionen die Proliferation von Immunzellen in Peyer Plaques inhibiert wird und bei fortgesetzter Emigration und regulärer Apoptose die Zellularität in diesem Organ abnimmt (Bekisz et al. 2010).

5.2.2.2.3. Verstärkte Emigration von Immunzellen aus Peyer Plaques nach systemischer Infektion

Der Darm stellt das größte Reservoir immunkompetenter Zellen im Organismus dar. (Kalliomaki et al. 2003). Erhöhte Typ I Interferon Spiegel führen über von dendritischen Zellen ab- und unabhängigen Mechanismen zur Differenzierung und Proliferation von T und B-Zellen, wie sie kürzlich von Mattei und Kollegen zusammengefasst wurden (Mattei et al. 2010). Auch wir ermittelten erhöhte Zellularität unter anderem in Milz und peripheren Lymphknoten nach Gabe von Poly(I:C). Die letzte hier diskutierte Möglichkeit, wie es zur erniedrigten Zellularität in Peyer Plaques nach systemischer Erhöhung der Interferon- α Spiegel kommt, ist die verstärkte Emigration von Immunzellen in lymphatische und nicht-lymphatische Organe.

Die Zirkulation und Migration von Lymphozyten wird durch die zum Teil gewebs- und effektspezifische Bildung von Chemokinen und Rezeptoren auf Geweben und Immunzellen orchestriert. So bilden die aus dem Thymus beziehungsweise Knochenmark ausgewanderten T und B-Zellen *chemokine receptor 7* aus, der nicht gewebsspezifisch ist und an die von peripheren lymphatischen Geweben produzierten *chemokine ligands 19* und *21* binden kann. Erfolgt beispielsweise in Peyer Plaques die Aktivierung von Lymphozyten durch die Präsentation von Antigen über dendritische Zellen, verlieren die Lymphozyten die Expression von *chemokine receptor 7* und L-Selektin und damit ihre Fähigkeit zur gewebsunabhängigen Migration. Die darmspezifischen dendritischen Zellen stimulieren selektiv die Expression von $\alpha_4\beta_7$ und *chemokine receptor 9* auf T-Zellen, wenn sie den naiven T-Zellen Antigene präsentieren und sie aktivieren. Nach der Emigration dieser nun aktivierten, spezifischen Lymphozyten, haben sie nur noch die Möglichkeit durch die Interaktion von $\alpha_4\beta_7$ mit MAdCAM-1 auf *high endothelial venules* des Darms und *chemokine receptor 9* mit *chemokine ligand 25* auf Epithelzellen des Dünndarms für eine Migration zu interagieren (Mora et al. 2003; Salmi et al. 2005; Johansson-Lindbom et al. 2007).

Kommt es nun zur nicht-gastrointestinalen, systemischen Infektion, bleibt auch das darmspezifische *priming* aus. So kann ein Teil des großen Pools an reifen, nicht darmspezifischen T und B-Zellen aus Peyer Plaques mobilisiert werden, um an einem anderen Ort im Organismus die Immunantwort zu unterstützen. Vor allem während der frühen Phase einer Infektion, bevor das adaptive Immunsystem durch Proliferation ein ausreichend großes Heer spezifischer Effektorzellen aufgebaut hat, könnte die schnelle Mobilisation großer Mengen vorhandener T und B-Zellen zur Verstärkung

einer Immunantwort essentiell sein. Dabei könnte ein zwischen Peyer Plaques und anderen sekundär lymphatischen Organen unterschiedliches Chemokin-Expressionsmuster die Lymphozyten zusätzlich zur gerichteten Mobilisation bewegen. So konnte gezeigt werden, dass Poly(I:C) und CpG zur Produktion der Chemokine CXCL9 bis 11 führen, die T-Zellen im Rahmen einer Inflammation anlocken (Taub et al. 1993; Gasperini et al. 1999; Inngjerdigen et al. 2001).

Es ist wahrscheinlich, dass nicht nur eine, sondern das Zusammenkommen mehrerer der hier diskutierten Möglichkeiten die verminderte Zellularität in Peyer Plaques nach Gabe von Poly(I:C) hervorruft.

5.3. Klinische Relevanz

Seit einigen Jahren wird intensiv am klinischen Einsatz von Immunstimulatoren aus der Gruppe der *Toll-like*-Rezeptoren und RIG-I-like Helikasen Liganden geforscht. Wie auch andere Gruppen konnten wir zeigen, dass CpG Oligodeoxynukleotide erfolgreich als Tumorstimulatoren im Mausmodell eingesetzt werden können. Zudem befindet sich CpG seit einiger Zeit in klinischen Studien als Therapeutikum für Infektionskrankheiten und maligne Prozesse (Bourquin et al. 2006; Krieg 2007; Bourquin et al. 2008; Hofmann et al. 2008; Krieg 2008). TLR7- und TLR8-Agonisten (Resiquimod [R-848], Imiquimod [R-837]) unterstützen die Antigen-spezifische T- und B-Zell Aktivierung (Bourquin et al. 2007) und besitzen antivirale (Fife et al. 2008) sowie antitumorale Aktivität (van Seters et al. 2008). Imiquimod wird topisch zur Therapie von Feigwarzen und Basaliomen eingesetzt. Auch die Stimulation von RIG-I mit 5'-Triphosphat RNA oder von MDA-5 mit Poly(I:C) zeigte im Mausmodell antitumorale Effekte (Tormo et al. 2006; Poeck et al. 2008). Amos und Kollegen zeigten kürzlich, dass die kombinierte, intratumorale Gabe von CpG und Poly(I:C) zusammen mit dem adoptiven Transfer aktivierter T-Zellen Melanome zur effektiveren Tumorrepression als eine alleinige Gabe von CpG bringen kann (Amos et al. 2012) Dies kann – wie in dieser Arbeit gezeigt – unter anderem an einer verstärkten Erhöhung der Interferon- α Spiegel nach Gabe von Poly(I:C) liegen.

Im Einleitungstext wurde die klinische Relevanz von Typ I Interferonen in onkologischen, infektiologischen und autoimmunologischen Erkrankungen besprochen. Die vorliegende Arbeit weist zum ersten Mal Auswirkungen erhöhter systemischer Interferon- α -Spiegel – sei es durch Infektion, bewusst durch klinische Therapie mit

Interferon- α oder durch Poly(I:C) – auf Peyer Plaques und Thymus im Mausmodell nach. Darüber hinaus konnten zelluläre Mechanismen beschrieben werden, die zu diesen Effekten beitragen.

Vor allem bei chronischen viralen Erkrankungen, die beispielsweise durch das Hepatitis C oder das Humane Immundefizienz Virus hervorgerufen werden sowie bei Dauertherapien mit Interferonen und seinen Induktoren, sollten die aufgezeigten Auswirkungen auf den Organismus mit in Betracht gezogen werden. Auch waren die Veränderungen in Thymus und Peyer Plaques nach sehr kurzer Zeit zu sehen, weshalb auf sie ebenfalls bei akuten viralen Erkrankungen wie sie vor allem im Kindesalter, bei Älteren und Immungeschwächten vorkommen, geachtet werden sollte.

Der Thymus stellt das zentrale Organ der T-Zell Entwicklung dar, welche durch Apoptose, reduzierte Proliferation und inhibierte Emigration nach gezeigter Stimulation und Infektion gestört werden könnte. So ist denkbar, dass chronische virale Erkrankungen zu einem unvollständig entwickelten Immunsystem vor allem der T-Zelllinie führen, da durch verminderte Zellularität und inhibierte Emigration der periphere Pool nur unvollständig ausgebildet werden kann. Zudem könnte eine gestörte positive und / oder negative Selektion von Thymozyten während oder nach viralen Infektionen zum Auftreten autoreaktiver T Lymphozyten in der Peripherie führen, was die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten begünstigt. So könnte auch im Erwachsenenalter das Risiko für Autoimmunkrankheiten, opportunistische Infektionen und maligne Erkrankungen durch eine gestörte Thymusintegrität erhöht werden.

Die verminderte Zellularität und aufgehobene mikroanatomische Architektur von Peyer Plaques durch Interferon- α beeinflusst aller Wahrscheinlichkeit nach die normalerweise fein abgestimmte Balance zwischen Barrierefunktion und Toleranz des Immunsystems im Darm stark. Es ist möglich, dass Therapien mit Typ I Interferonen oder systemische virale Erkrankungen das Auftreten, die Dauer und die Intensität gastrointestinaler Infekte begünstigen, unabhängig davon, ob diese viralen, bakteriellen oder parasitären Ursprungs sind. „Einfache“ gastrointestinale Infektionen bergen vor allem die Gefahr der Dehydratation, die auch noch heutzutage zu einer Vielzahl von Todesfällen führt. Erreger „schwerer“ gastrointestinaler Infektionen können darüber hinaus zum Blutabgang über den Darm führen, oder die Barriere des Darms durchdringen und zu systemischen Infektionen (z. B. Bakteriämie, Sepsis) mit potentiell verheerenden Folgen führen.

Auf der anderen Seite könnten Interferon- α oder seine Induktoren wie Poly(I:C) in der Therapie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa ihren Einsatz finden. Zwar spielen proinflammatorische Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor- α , Interleukin-1 β und Interleukin-6 in der Pathogenese dieser Erkrankungen eine entscheidende Rolle (Strober et al.), doch könnte die diskutierte, verminderte Immigration und erhöhte Emigration von Immunzellen das Ausmaß von akuten Schüben limitieren.

6. Zusammenfassung

Interferon- α befindet sich seit vielen Jahren in klinischer Verwendung. Neben dem Einsatz bei onkologischen, viralen und autoimmunologischen Erkrankungen wird an weiteren klinischen Einsatzmöglichkeiten geforscht. Auch synthetische, immunstimulatorische Nukleinsäuren wie Cytosin-Phosphat-Guanin und *polyinosinic:polycytidylic acid* werden in ihrem pharmakologischen Potenzial seit einigen Jahren untersucht und zeigen in Klinik und Tiermodellen vielversprechende Einsatzmöglichkeiten. Vor allem auf dem Gebiet der Tumorimmunologie wird ihnen ein präventives und therapeutisches Potenzial zugeschrieben.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war der Zufallsbefund, dass durch Immunstimulation mit Poly(I:C) eine Thymusinvolution zu beobachten ist. Das Ziel des ersten Teils der Arbeit war eine tiefergehende Beschreibung des Befundes sowie die Untersuchung der dahinter liegenden Mechanismen. Zudem sollten die Auswirkungen systemischer viraler Erkrankungen und der direkte Effekt von Interferon- α auf den Thymus beschrieben werden. In einem zweiten Schritt sollten weitere primäre und sekundäre lymphatische Organe auf ähnliche Reaktionen untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass auch in Peyer Plaques ein massiver Zellverlust nach entsprechender systemischer Immunstimulation zu verzeichnen ist. Dieser Zellverlust sollte weiter beschrieben und die dazu führenden Mechanismen untersucht werden. Schließlich sollten die Konsequenzen für den Organismus sowie die physiologische und klinische Relevanz dieser Reaktionen des Immunsystems diskutiert werden.

Wir benutzten zunächst Poly(I:C), um die Auswirkungen doppelsträngiger RNA – wie sie in einigen Viren vorkommt – auf den Mausorganismus zu untersuchen. Diese führte in Abhängigkeit von der Dosis zu massivem Zellverlust in Thymus und Peyer Plaques der Versuchstiere. Histologische Untersuchungen ergaben, dass die sonst klare mikroanatomische Struktur beider Organe nach Administration von Poly(I:C) aufgehoben war. Die Veränderungen an Thymus und Peyer Plaques erwiesen sich als temporär. Sie zeigten sich nach 48 Stunden als intensiv ausgeprägt, waren jedoch etwa zwei Wochen nach der letzten von zwei Poly(I:C) Injektionen nicht mehr zu erkennen.

Zudem wiesen wir nach, dass diese Veränderungen nicht nur durch Poly(I:C), sondern auch durch das in der Natur vorkommende *vesicular stomatitis virus* hervorgerufen werden. Durch Versuche mit Interferon- α -Rezeptor defizienten Mäusen und der

alleinigen Gabe von Interferon- α bewiesen wir, dass dieses Zytokin den zentralen Mediator der Effekte auf Thymus und Peyer Plaques darstellt. Weitere Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Poly(I:C) über *melanoma differentiation-associated gene 5* und nicht – wie zuvor angenommen – über TLR3 die Effekte auf den Thymus vermittelt. Zudem wirkt hierbei Interferon- α nicht direkt auf Thymozyten.

Darüber hinaus konnten verstärkte Apoptose und erniedrigte Proliferation von Thymozyten nach Gabe von Poly(I:C) als Ursachen des Zellverlustes im Thymus identifiziert werden. Untersuchungen zur pathophysiologischen Funktion dieses Zellverlustes in Thymus und Peyer Plaques nach systemischen Virusinfektionen stellen einen interessanten Ausgangspunkt weiterer Forschung dar.

Mit dieser Arbeit wurden signifikante Auswirkungen systemischer Virusinfektionen, synthetischer doppelsträngiger RNA und erhöhter Interferon- α -Spiegel auf Thymus und Peyer Plaques nachgewiesen.

7. Literaturverzeichnis

- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, et al. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-8.
- Alpan, O., G. Rudomen, et al. (2001). "The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses." J Immunol **166**(8): 4843-52.
- Amos, S. M., H. J. Pegram, et al. (2012). "Adoptive immunotherapy combined with intratumoral TLR agonist delivery eradicates established melanoma in mice." Cancer Immunol Immunother **60**(5): 671-83.
- Anderson, G., N. C. Moore, et al. (1996). "Cellular interactions in thymocyte development." Annu Rev Immunol **14**: 73-99.
- Anz, D., R. Thaler, et al. (2009). "Activation of melanoma differentiation-associated gene 5 causes rapid involution of the thymus." J Immunol **182**(10): 6044-50.
- Bekisz, J., S. Baron, et al. (2010). "Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon." Pharmaceuticals (Basel) **3**(4): 994-1015.
- Berberich, C., J. R. Ramirez-Pineda, et al. (2003). "Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens." J Immunol **170**(6): 3171-9.
- Berlin, C., E. L. Berg, et al. (1993). "Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1." Cell **74**(1): 185-95.
- Billiau, A. (1996). "Interferon-gamma in autoimmunity." Cytokine Growth Factor Rev **7**(1): 25-34.
- Bogdan, C. (2000). "The function of type I interferons in antimicrobial immunity." Curr Opin Immunol **12**(4): 419-24.
- Bourquin, C., D. Anz, et al. (2008). "Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity." J Immunol **181**(5): 2990-8.
- Bourquin, C., L. Schmidt, et al. (2007). "Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response." Blood **109**(7): 2953-60.
- Bourquin, C., S. Schreiber, et al. (2006). "Immunotherapy with dendritic cells and CpG oligonucleotides can be combined with chemotherapy without loss of efficacy in a mouse model of colon cancer." Int J Cancer **118**(11): 2790-5.
- Boursalian, T. E., J. Golob, et al. (2004). "Continued maturation of thymic emigrants in the periphery." Nat Immunol **5**(4): 418-25.
- Cai, A. Q., K. A. Landman, et al. (2007). "T cell development in the thymus: from periodic seeding to constant output." J Theor Biol **249**(2): 384-94.
- Ceredig, R. and T. Rolink (2002). "A positive look at double-negative thymocytes." Nat Rev Immunol **2**(11): 888-97.
- Chino, F., H. Kodama, et al. (1979). "Alterations of the thymus and peripheral lymphoid tissues in fatal measles. A review of 14 autopsy cases." Acta Pathol Jpn **29**(3): 493-507.
- Cooksley, W. G. (2004). "The role of interferon therapy in hepatitis B." MedGenMed **6**(1): 16.
- Deal, E. M., M. C. Jaimes, et al. (2010). "Rotavirus structural proteins and dsRNA are required for the human primary plasmacytoid dendritic cell IFNalpha response." PLoS Pathog **6**(6): e1000931.
- Demoulin, T., A. Abdallah, et al. (2008). "Reversible blockade of thymic output: an inherent part of TLR ligand-mediated immune response." J Immunol **181**(10): 6757-69.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, et al. (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." Science **303**(5663): 1529-31.

- Dostert, C., E. Meylan, et al. (2008). "Intracellular pattern-recognition receptors." Adv Drug Deliv Rev **60**(7): 830-40.
- Drayton, D. L., S. Liao, et al. (2006). "Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis." Nat Immunol **7**(4): 344-53.
- Edelmann, K. H., S. Richardson-Burns, et al. (2004). "Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections?" Virology **322**(2): 231-8.
- Farrar, M. A. and R. D. Schreiber (1993). "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor." Annu Rev Immunol **11**: 571-611.
- Feng, C., K. J. Woodside, et al. (2002). "A potential role for CD69 in thymocyte emigration." Int Immunol **14**(6): 535-44.
- Fife, K. H., T. C. Meng, et al. (2008). "Effect of resiquimod 0.01% gel on lesion healing and viral shedding when applied to genital herpes lesions." Antimicrob Agents Chemother **52**(2): 477-82.
- Foss, D. L., E. Donskoy, et al. (2001). "The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice." J Exp Med **193**(3): 365-74.
- Fruchtman, S. M. (2004). "Treatment paradigms in the management of myeloproliferative disorders." Semin Hematol **41**(2 Suppl 3): 18-22.
- Fuertes Marraco, S. A., C. L. Scott, et al (2011). "Type I Interferon Drives Dendritic Cell Apoptosis via Multiple BH3-Only Proteins following Activation by PolyI:C In Vivo." PLoS One **6**(6): e20189.
- Fukata, M. and M. T. Abreu (2009). "Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut." Curr Opin Pharmacol **9**(6): 680-7.
- Gasperini, S., M. Marchi, et al. (1999). "Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils." J Immunol **162**(8): 4928-37.
- Germain, R. N. (2002). "T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision." Nat Rev Immunol **2**(5): 309-22.
- Gitlin, L., W. Barchet, et al. (2006). "Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(22): 8459-64.
- Goldstein, D. and J. Laszlo (1988). "The role of interferon in cancer therapy: a current perspective." CA Cancer J Clin **38**(5): 258-77.
- Greene, J. J., J. L. Alderfer, et al. (1978). "Interferon induction and its dependence on the primary and secondary structure of poly(inosinic acid).poly(cytidylic acid)." Biochemistry **17**(20): 4214-20.
- Gurney, K. B., A. D. Colantonio, et al. (2004). "Endogenous IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells exerts an antiviral effect on thymic HIV-1 infection." J Immunol **173**(12): 7269-76.
- Hayashi, F., K. D. Smith, et al. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-103.
- Heil, F., H. Hemmi, et al. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." Science **303**(5663): 1526-9.
- Hemmi, H., T. Kaisho, et al. (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat Immunol **3**(2): 196-200.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-5.
- Hewson, C. A., A. Jardine, et al. (2005). "Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells." J Virol **79**(19): 12273-9.
- Hofmann, M. A., C. Kors, et al. (2008). "Phase 1 evaluation of intralesionally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma." J Immunother **31**(5): 520-7.

- Hoshino, K., O. Takeuchi, et al. (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." J Immunol **162**(7): 3749-52.
- Imler, J. L. and J. A. Hoffmann (2001). "Toll receptors in innate immunity." Trends Cell Biol **11**(7): 304-11.
- Inngjerdengen, M., B. Damaj, et al. (2001). "Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells." Blood **97**(2): 367-75.
- Isaacs, A., H. G. Klemperer, et al. (1961). "Studies on the mechanism of action of interferon." Virology **13**: 191-9.
- Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 258-67.
- Ishikawa, T. (2008). "Secondary prevention of recurrence by interferon therapy after ablation therapy for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients." World J Gastroenterol **14**(40): 6140-4.
- Iwasaki, A. (2007). "Mucosal dendritic cells." Annu Rev Immunol **25**: 381-418.
- Iwasaki, A. and B. L. Kelsall (1999). "Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells." J Exp Med **190**(2): 229-39.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Johansson, C., J. D. Wetzell, et al. (2007). "Type I interferons produced by hematopoietic cells protect mice against lethal infection by mammalian reovirus." J Exp Med **204**(6): 1349-58.
- Johansson-Lindbom, B. and W. W. Agace (2007). "Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa." Immunol Rev **215**: 226-42.
- Jurk, M., F. Heil, et al. (2002). "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848." Nat Immunol **3**(6): 499.
- Kalliomaki, M. and E. Isolauri (2003). "Role of intestinal flora in the development of allergy." Curr Opin Allergy Clin Immunol **3**(1): 15-20.
- Kamphuis, E., T. Junt, et al. (2006). "Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia." Blood **108**(10): 3253-61.
- Kato, H., S. Sato, et al. (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." Immunity **23**(1): 19-28.
- Kato, H., O. Takeuchi, et al. (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." Nature **441**(7089): 101-5.
- Kawai, T. and S. Akira (2007). "TLR signaling." Semin Immunol **19**(1): 24-32.
- Kawai, T. and S. Akira (2008). "Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling." Ann N Y Acad Sci **1143**: 1-20.
- Kawai, T., K. Takahashi, et al. (2005). "IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction." Nat Immunol **6**(10): 981-8.
- Kelsall, B. L. and W. Strober (1996). "Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch." J Exp Med **183**(1): 237-47.
- King, C. K., R. Glass, et al. (2003). "Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy." MMWR Recomm Rep **52**(RR-16): 1-16.
- Kirkwood, J. M., J. G. Ibrahim, et al. (2002). "Interferon alfa-2a for melanoma metastases." Lancet **359**(9310): 978-9.
- Kirkwood, J. M., M. H. Strawderman, et al. (1996). "Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684." J Clin Oncol **14**(1): 7-17.
- Krieg, A. M. (1999). "Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides." Biochim Biophys Acta **1489**(1): 107-16.
- Krieg, A. M. (2007). "Development of TLR9 agonists for cancer therapy." J Clin Invest **117**(5): 1184-94.

- Krieg, A. M. (2008). "Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer." Oncogene **27**(2): 161-7.
- Kurt-Jones, E. A., L. Popova, et al. (2000). "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus." Nat Immunol **1**(5): 398-401.
- Le Bon, A., G. Schiavoni, et al. (2001). "Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo." Immunity **14**(4): 461-70.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-83.
- Lin, Q., C. Dong, et al. (1998). "Impairment of T and B cell development by treatment with a type I interferon." J Exp Med **187**(1): 79-87.
- Lind, E. F., S. E. Prockop, et al. (2001). "Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development." J Exp Med **194**(2): 127-34.
- Lopez, S. and C. F. Arias (2004). "Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance." Trends Microbiol **12**(6): 271-8.
- Lopez-Guerrero, D. V., S. Meza-Perez, et al. (2010). "Rotavirus infection activates dendritic cells from Peyer's patches in adult mice." J Virol **84**(4): 1856-66.
- Ma, D., D. Jiang, et al. (2009). "Antiviral effect of interferon lambda against West Nile virus." Antiviral Res **83**(1): 53-60.
- Marrack, P., J. Kappler, et al. (1999). "Type I interferons keep activated T cells alive." J Exp Med **189**(3): 521-30.
- Matsumoto, M., K. Funami, et al. (2003). "Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells." J Immunol **171**(6): 3154-62.
- Mattei, F., G. Schiavoni, et al. (2010). "Regulation of immune cell homeostasis by type I interferons." Cytokine Growth Factor Rev **21**(4): 227-36.
- Meyer, O. (2009). "Interferons and autoimmune disorders." Joint Bone Spine.
- Meylan, E. and J. Tschopp (2006). "Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses." Mol Cell **22**(5): 561-9.
- Miller, J. F. and D. Osoba (1967). "Current concepts of the immunological function of the thymus." Physiol Rev **47**(3): 437-520.
- Mora, J. R., M. R. Bono, et al. (2003). "Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells." Nature **424**(6944): 88-93.
- Morrison, S. J., N. Uchida, et al. (1995). "The biology of hematopoietic stem cells." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 35-71.
- Muller, M., H. Ibelgaufts, et al. (1994). "Interferon response pathways--a paradigm for cytokine signalling?" J Viral Hepat **1**(2): 87-103.
- Murali, A., X. Li, et al. (2008). "Structure and function of LGP2, a DEX(D/H) helicase that regulates the innate immunity response." J Biol Chem **283**(23): 15825-33.
- Niedergang, F. and M. N. Kweon (2005). "New trends in antigen uptake in the gut mucosa." Trends Microbiol **13**(10): 485-90.
- Niess, J. H. and H. C. Reinecker (2005). "Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract." Curr Opin Gastroenterol **21**(6): 687-91.
- Niess, J. H. and H. C. Reinecker (2006). "Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota." Cell Microbiol **8**(4): 558-64.
- Okada, T., Z. X. Lian, et al. (2003). "Murine thymic plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **33**(4): 1012-9.
- Onodera, T., T. Taniguchi, et al. (1991). "Thymic atrophy in type 2 reovirus infected mice: immunosuppression and effects of thymic hormone. Thymic atrophy caused by reo-2." Thymus **18**(2): 95-109.
- Ortaldo, J. R., N. P. Lang, et al. (1981). "Augmentation of human natural killer cell activity by interferon: conditions required for boosting and characteristics of the effector cells." J Interferon Res **1**(2): 253-62.

- Ozinsky, A., D. M. Underhill, et al. (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-71.
- Paolicelli, D., V. Drenth, et al. (2009). "Review of interferon beta-1b in the treatment of early and relapsing multiple sclerosis." Biologics **3**: 369-76.
- Parashar, U. D., C. J. Gibson, et al. (2006). "Rotavirus and severe childhood diarrhea." Emerg Infect Dis **12**(2): 304-6.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity." Microbes Infect **6**(15): 1382-7.
- Penit, C., B. Lucas, et al. (1995). "Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice." J Immunol **154**(10): 5103-13.
- Pestka, S. (2000). "The human interferon alpha species and receptors." Biopolymers **55**(4): 254-87.
- Petrie, H. T. and J. C. Zuniga-Pflucker (2007). "Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus." Annu Rev Immunol **25**: 649-79.
- Poeck, H., R. Besch, et al. (2008). "5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma." Nat Med **14**(11): 1256-63.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.
- Randall, T. D., D. M. Carragher, et al. (2008). "Development of secondary lymphoid organs." Annu Rev Immunol **26**: 627-50.
- Rosztoczy, I. (1986). "Study of the in vivo priming effect of interferon in mice." J Gen Virol **67** (Pt 12): 2731-7.
- Salmi, M. and S. Jalkanen (2005). "Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment." Immunol Rev **206**: 100-13.
- Schmidlin, H., W. Dontje, et al. (2006). "Stimulated plasmacytoid dendritic cells impair human T-cell development." Blood **108**(12): 3792-800.
- Schon, M. P. and M. Schon (2008). "TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy." Oncogene **27**(2): 190-9.
- Schroder, M. and A. G. Bowie (2005). "TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander?" Trends Immunol **26**(9): 462-8.
- Scolley, R. G., E. C. Butcher, et al. (1980). "Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice." Eur J Immunol **10**(3): 210-8.
- Shepherd, J., N. Waugh, et al. (2000). "Combination therapy (interferon alfa and ribavirin) in the treatment of chronic hepatitis C: a rapid and systematic review." Health Technol Assess **4**(33): 1-67.
- Shiow, L. R., D. B. Rosen, et al. (2006). "CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs." Nature **440**(7083): 540-4.
- Sprent, J., E. K. Gao, et al. (1990). "T cell reactivity to MHC molecules: immunity versus tolerance." Science **248**(4961): 1357-63.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Steinman, R. M. and H. Hemmi (2006). "Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity." Curr Top Microbiol Immunol **311**: 17-58.
- Streeter, P. R., E. L. Berg, et al. (1988). "A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing." Nature **331**(6151): 41-6.
- Strober, W. and I. J. Fuss "Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **140**(6): 1756-67.
- Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.

- Takeuchi, O., K. Hoshino, et al. (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." Immunity **11**(4): 443-51.
- Takeuchi, O., A. Kaufmann, et al. (2000). "Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway." J Immunol **164**(2): 554-7.
- Taub, D. D., A. R. Lloyd, et al. (1993). "Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells." J Exp Med **177**(6): 1809-14.
- Tezuka, H. and T. Ohteki (2010). "Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells." Immunol Rev **234**(1): 247-58.
- Tormo, D., A. Ferrer, et al. (2006). "Therapeutic efficacy of antigen-specific vaccination and toll-like receptor stimulation against established transplanted and autochthonous melanoma in mice." Cancer Res **66**(10): 5427-35.
- Tough, D. F., P. Borrow, et al. (1996). "Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo." Science **272**(5270): 1947-50.
- Trinchieri, G. (2010). "Type I interferon: friend or foe?" J Exp Med **207**(10): 2053-63.
- Trinchieri, G. and A. Sher (2007). "Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence." Nat Rev Immunol **7**(3): 179-90.
- Underhill, D. M., A. Ozinsky, et al. (1999). "Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14459-63.
- van Seters, M., M. van Beurden, et al. (2008). "Treatment of vulvar intraepithelial neoplasia with topical imiquimod." N Engl J Med **358**(14): 1465-73.
- Vandenabeele, S., H. Hochrein, et al. (2001). "Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations." Blood **97**(6): 1733-41.
- Vasilakos, J. P., R. M. Smith, et al. (2000). "Adjuvant activities of immune response modifier R-848: comparison with CpG ODN." Cell Immunol **204**(1): 64-74.
- Vasseur, F., A. Le Campion, et al. (2001). "Scheduled kinetics of cell proliferation and phenotypic changes during immature thymocyte generation." Eur J Immunol **31**(10): 3038-47.
- Vermes, I., C. Haanen, et al. (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." J Immunol Methods **184**(1): 39-51.
- Vidalain, P. O., D. Laine, et al. (2002). "Interferons mediate terminal differentiation of human cortical thymic epithelial cells." J Virol **76**(13): 6415-24.
- Wang, T., T. Town, et al. (2004). "Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis." Nat Med **10**(12): 1366-73.
- Weissman, I. L., T. Masuda, et al. (1975). "Differentiation of migration of T lymphocytes." Isr J Med Sci **11**(12): 1267-77.
- White, R. G. and J. F. Boyd (1973). "The effect of measles on the thymus and other lymphoid tissues." Clin Exp Immunol **13**(3): 343-57.
- Witt, C. M., S. Raychaudhuri, et al. (2005). "Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time." PLoS Biol **3**(6): e160.
- Yarovinsky, F., D. Zhang, et al. (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." Science **308**(5728): 1626-9.
- Yoneyama, M. and T. Fujita (2007). "Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity." J Biol Chem **282**(21): 15315-8.
- Zamisch, M., B. Moore-Scott, et al. (2005). "Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells." J Immunol **174**(1): 60-7.
- Zhang, D., G. Zhang, et al. (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." Science **303**(5663): 1522-6.
- Zhang, X., S. Sun, et al. (1998). "Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15." Immunity **8**(5): 591-9.

- Zhou, R., H. Wei, et al. (2007). "Recognition of double-stranded RNA by TLR3 induces severe small intestinal injury in mice." J Immunol **178**(7): 4548-56.
- Zlotoff, D. A., B. A. Schwarz, et al. (2008). "The long road to the thymus: the generation, mobilization, and circulation of T-cell progenitors in mouse and man." Semin Immunopathol **30**(4): 371-82.

8. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

Balb/c	(17)	Eine häufig verwendete Albino-Mauslinie
bp	(7)	Basenpaar
BrdU	(16)	Bromdesoxyuridin
C57BL/6	(17)	“C57 Black 6”, eine häufig verwendete Mauslinie
CD	(14)	<i>Cluster of differentiation</i>
CpG	(6)	Cytosin-Phosphat-Guanin
DC	(2)	Dendritische Zelle
DN	(10)	Doppelt negativ
DNA	(3)	Desoxyribonukleinsäuren
ds	(5)	Doppelsträngig
FITC	(16)	Fluorescein-Isocyanat
FSC	(21)	<i>Forward scatter</i>
HE	(19)	Hämatoxylin-Eosin
i.p.	(24)	Intraperitoneal
IFNAR	(8)	Typ I Interferon Rezeptor
IFNAR ^{-/-}	(17)	Interferon-α Rezeptor Knockout Maus
Ig	(2)	Immunglobulin
IL	(5)	Interleukin
IRF	(4)	<i>Interferon-regulatory factor</i>
LPS	(4)	Lipopolysaccharid
M Zellen	(13)	<i>Microfold-Zellen</i>
MAdCAM-1	(55)	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule 1</i>
MDA-5	(4)	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
mDC	(8)	Myeloide dendritische Zelle
MHC	(11)	<i>Major histocompatibility complex</i>
mm	(12)	Millimeter
MyD88	(6)	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
NF-κB	(4)	<i>Nuclear factor-κB</i>
NK-Zellen	(2)	Natürliche Killerzelle
PAMP	(3)	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	(13)	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pDC	(8)	Periphere dendritische Zelle
PI	(23)	Propidiumjodid

Poly(I:C)	(1)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
R-848	(4)	Resiquimod
RNA	(4)	Ribonukleinsäure
s.c.	(40)	Subkutan
SEM	(25)	<i>Standard error of mean</i>
ss	(5)	Einzelsträngig
SSC	(21)	<i>Side scatter</i>
TCR	(11)	T-Zell-Rezeptor
TLR	(3)	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
TNF	(5)	Tumor-Nekrose-Faktor- α
T _{reg}	(10)	Regulatorische T-Zelle
VSV	(38)	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
WT	(6)	Wildtyp

9. Danksagung

Zunächst möchte ich meinen Eltern danken. Besonders meiner Mutter, die mit ihrer unermüdlichen Unterstützung nicht nur diese Arbeit, sondern mich in meinem ganzen Studium beflügelte, sowie meinem Vater, der dieses überhaupt erst möglich machte.

Als nächstes gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Endres, der es nach wie vor wie kein Zweiter vermag, eine freundliche, geradezu familiäre Atmosphäre in der Abteilung zu schaffen und damit alle positiv zu motivieren und zu begeistern. Er war und ist mir Mentor, Förderer und Wegbereiter. Ich bin Professor Endres überaus dankbar.

Ich danke außerordentlich meiner Betreuerin Frau Professor Dr. Dr. Carole Bourquin für den geduldigen Rat, die Vision und exzellente Führung. Sie machte unsere Arbeitsgruppe zur offenen und gut funktionierenden Einheit und verstand es immer wieder, aus den vielen Ideen die für mich lohnendsten Experimente zu destillieren.

Weiterer Dank gilt Dr. David Anz, dessen fortwährender Forschungselan und positive Einstellung eine Inspiration und seine tatkräftige Unterstützung eine große Hilfe für meine Arbeit waren. Ich danke meinen Kollegen und Freunden aus der Arbeitsgruppe – ganz besonders Cornelia Wurzenberger, Raffael Thaler, Stefan Moder, Wolfgang Müller und Nadja Sandholzer – für ihre Hilfe und die äußerst angenehme Zusammenarbeit, die die Zeit in der Abteilung zu einer Unvergesslichen machen.

Ferner danke ich herzlich unseren Partnern PD Dr. Anne Krug, Dr. rer. nat. Susanne Radtke-Schuller, Dr. Martin Schlapschy und Dr. Zoe Waibler für die Durchführung viraler Infektionen, Erstellung von histologischen Präparaten und die Bereitstellung von rekombinantem Interferon- α sowie spezieller Mauslinien.

10. Veröffentlichungen

Originalarbeiten

1. Heidegger S., Anz D., **Stephan N.**, Bohn B., Herbst T., Fendler W.P., Suhartha N., Sandholzer N., Kobold S., Hotz C., Eisenächer K., Radtke-Schuller S., Endres S., Bourquin C. (2013): „Virus-associated activation of innate immunity induces rapid disruption of Peyer's patches in mice" Blood 2013 July 03; Impact factor: 9.1 (2012 Journal Citation Reports)
2. Anz D., Thaler R., **Stephan N.**, Waibler Z., Trauscheid M. J., Scholz C., Kalinke U., Barchet W., Endres S., Bourquin C. (2009): „Activation of Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Causes Rapid Involution of the Thymus" J Immunol 2009 May 15;182(10):6044-50; Impact factor: 5.8 (2011 Journal Citation Reports)
3. Heidegger S., Kirchner S.K., **Stephan N.**, Bohn B., Suhartha N., Hotz C., Anz D., Sandholzer N., Stecher B., Rüssmann H., Endres S., Bourquin C.: „TLR activation excludes naive CD8+ T cells from gut-associated lymphoid organs in mice"; J Immunol 2013 May 15;190(10):5313-20; Impact factor: 5.8 (2011 Journal Citation Reports)

Poster

Stephan N., Thaler R., Waibler Z., Trauscheid M. J., Scholz C., Kalinke U., Barchet W., Anz D., Endres S., Bourquin C.: „Activation of Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Causes Rapid Involution of the Thymus¹"

Poster auf dem " LMU-Harvard Young Scientists' Forum 2009 - From Molecules to Organisms" in München, 21. bis 24.06.2009

Stephan N., Anz D., Bourquin C., Endres E.: „Die Durchflusszytometrie als essentielle Methode zur Beantwortung immunologischer Fragestellungen"

Poster auf den „Doktorarbeitstagen Medizin 2009" in München, 24. bis 25. Juni 2009

Vorträge

Stephan N., Anz D., Bourquin C., Endres E.: „Poly(I:C)-induced production of Type-I Interferons causes rapid involution of the thymus“

Vortrag beim „Wochenendseminar des 7. Promotionsstudiums Molekulare und Systembiologische Medizin“